N° d'enregistrement
au CNRS

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

BROD Joël

Action de certains dérivés soufrés sur le métabolisme lipidique cutané du rat

---

Soutenue le : JUIN 1973 devant la commission d'examen

J. POLONOVSKI — Président

M. PASCAUD
M. PRUNIERAS
G. MANOUSSOS
G. AUBIN — Examinateurs

N° d'enregistrement
au CNRS

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

BROD Joël

Action de certains dérivés soufrés sur le métabolisme lipidique cutané du rat

---

Soutenue le : JUIN 1973 devant la commission d'examen

J. POLONOVSKI	Président
M. PASCAUD M. PRUNIERAS G. MANOUSSOS G. AUBIN	Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma femme,

A mes enfants,

A la mémoire de ma mère,

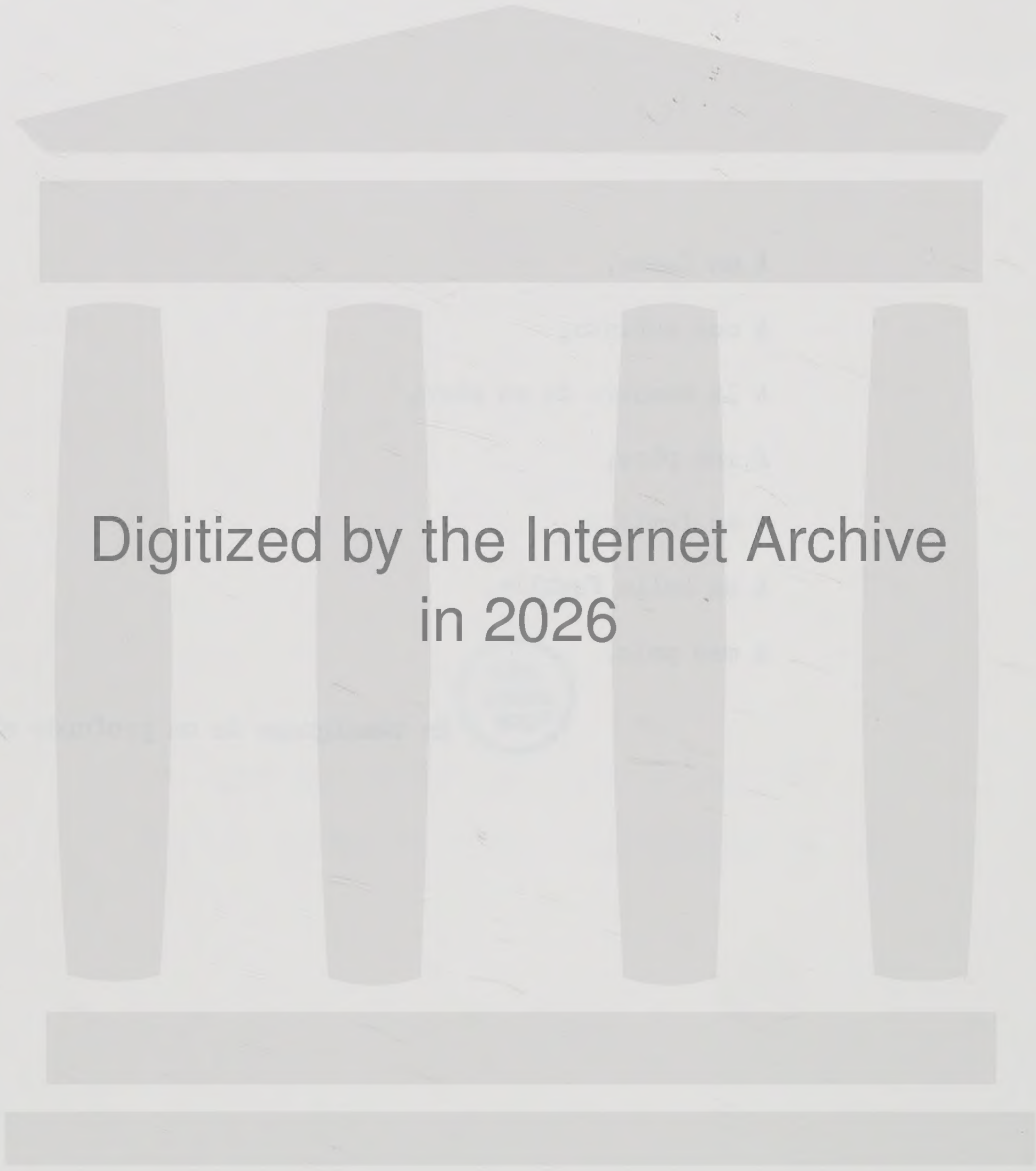
A mon père,

A ma famille,

A ma belle famille,

A mes amis.

En témoignage de ma profonde affection.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543920_0025

Monsieur J.POLONOVSKI, Professeur à la faculté de médecine de Saint Antoine - Paris VI nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence du Jury de notre thèse. Nous lui exprimons ici notre profonde reconnaissance.

Nous remercions Monsieur M.PASCAUD, Professeur à la faculté des Sciences de Paris VI qui a bien voulu assumer la direction de ce travail, nous a stimulé par ses encouragements et nous a fait profiter de sa grande compétence. Nous lui exprimons notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur PRUNIERAS, directeur de recherches à l'I.N.S.E.R.M a bien voulu accepter de juger notre travail après nous avoir guidé avec bienveillance dans les études de microscopie électronique. Qu'il trouve ici l'expression de notre très vive reconnaissance.

Monsieur G.KALOPISSIS, directeur de recherches à l'OREAL nous a fait l'honneur de nous accueillir dans ses laboratoires. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma respectueuse gratitude.

Ce travail a été effectué dans le département de Biologie de l'OREAL dirigé par le Docteur MANOUSSOS qui n'a jamais cessé de nous éclairer de ses précieux conseils et nous a apporté ses encouragements tout au long de ce travail dont il a suivi toutes les étapes. Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux attachement.

Nous sommes heureux de remercier Monsieur G.AUBIN. Nous voudrions qu'il sache combien nous avons été sensible à son inlassable dévouement continuellement mis à contribution. Ses hautes connaissances dans le domaine de la biochimie nous ont été d'un secours inestimable. Sa foi scientifique et son esprit d'équipe nous serviront d'exemple.

Nous tenons à remercier très sincèrement tous nos camarades du département de Biologie et plus particulièrement Mesdames VILA et DELAHAIE, Mademoiselle BAGUE et Messieurs CORCUFF et BOUILLON pour leur aide précieuse et efficace qui a grandement facilité l'accomplissement de ce travail.

Nous exprimons notre reconnaissance à Mademoiselle REGNIER et Monsieur CESARINI pour leur précieuse collaboration lors de nos études en microscopie électronique.

INTRODUCTION

La peau possède une quantité importante de lipides dont la nature peut être variable selon leur origine et leur localisation. On retrouve, en particulier, des lipides de réserve au niveau hypodermique et dermique et des lipides nettement spécifiques d'origine sébacée et épidermique dont le métabolisme ne serait pas tributaire des mêmes influences nerveuses, hormonales, nutritionnelles et autres.

Ainsi, le contrôle de l'activité sécrétoire de la glande sébacée, par certaines fibres nerveuses, est connu depuis trés longtemps puisque dès 1891, ARLOING (1), en stimulant le ganglion sympathique cervical, montrait qu'il augmentait la sécrétion de cette glande. Cependant, il faudra attendre 1960 pour que HERXHEIMER mette en évidence l'existence de fibres vasoconstrictrices appartenant organiquement au système orthosympathique au niveau de la membrane basale de la glande sébacée (2).

KORTING, plus récemment en 1967, confirmait l'existence de ces fibres amyéliniques par microscopie électronique (3). Si l'hypersécrétion de la glande sébacée obtenue après stimulation du système sympathique ne fait plus de doute, par contre, on discute encore du rôle des fibres vasodilatrices de la peau (4). Actuellement, on pense que la vasodilatation des vaisseaux qui entourent la glande sébacée pourrait être une conséquence du relâchement du tonus vasoconstricteur (5) (6).

Toujours en ce qui concerne l'excrètion des lipides d'origine sébacée et épidermique, les travaux effectués ces dernières années, tant chez l'animal que chez l'homme, ont montré que l'excrètion du sébum était continue et que cette excrètion était sous contrôle hormonal. L'effet des androgènes, surtout de la testostérone et de ses métabolites, est de stimuler la sécrétion sébacée (7) (8) (9) (10). Le rôle des oestrogènes est plus controversé : ils diminuent l'excrétion du sébum (11) (12).

Selon les indications récentes de REISNER (13), l'oestradiol agirait en inhibant compétitivement l'enzyme responsable de la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone, ce dernier métabolite étant reconnu comme le dérivé actif de la testostérone dans l'hypersécrétion du sébum. Le rôle de la progestérone a pu être également précisé (14) (15) (16) ; de fortes doses de cette hormone stimulent la glande sébacée.

La sécrétion sébacée est également influencée par le régime alimentaire. Ainsi, lorsque des rats ou des lapins sont nourris avec des régimes supplémentés en graisses ou en sucres (17), le taux de sébum tend à augmenter de plus de 50 % en deux semaines. Nous-mêmes avons pu observer ce phénomène après administration à des rats d'un régime supplémenté en oléate d'oléyle et en huile de spermaceti. Chez l'homme, certaines dermatoses séborrhéiques trouvent leur origine également dans des régimes mal équilibrés ; c'est ainsi que de nombreux cas de dermatite séborrhéique de l'enfant sont dûs à des laits maternels trop riches en graisses ou ayant une teneur insuffisante en protéines. Notons également que dans les cas de séborrhées dues à des troubles nutritionnels de ce type, les lipides excrètés au niveau cutané sont beaucoup plus sensibles à l'action lipolytique des saprophytes cutanés (Pityrosporum ovale, Corynebacterium acnes, Staphylococcus albus,etc ...) . Il s'ensuit un taux accru d'acides gras libres dont l'excès est générateur lui-même de séborrhée (18) (19).

Par ailleurs, on connaît le rôle des vitamines au niveau de la peau ; la peau est gravement affectée par les carences vitaminiques. Si de nombreuses hypovitaminoses provoquent des lésions cutanées, en particulier au niveau de l'épiderme, par contre, peu de vitamines semblent agir directement sur la glande sébacée en dehors de la biotine dont la carence provoque une dermatose séborrhéique s'étendant à tout le corps (20). La carence en biotine engendre chez le rat des perturbations dans le métabolisme se traduisant par une élimination des lipides sur la surface de la peau en même temps qu'une nette alopécie se développe. La vitamine E semble également importante au niveau cutané. Elle agirait à ce niveau au même titre que l'ubiquinone comme réducteur vis-à-vis des peroxydes lipidiques auxquels la glande sébacée est très sensible.

Ainsi, la régulation du mécanisme de la sécrétion du sébum apparaît comme un phénomène complexe. Toute perturbation de cette régulation amène des déviations dans la sécrétion de cette glande. Parmi ces déviations retenons celles qui engendrent un excès de sébum. De nombreuses substances ont été utilisées pour corriger l'hypersécrétion de la glande sébacée dont le soufre et ses dérivés, sans que d'ailleurs le mécanisme d'action de ces substances soit bien élucidé. Cependant, un certain nombre d'auteurs ont montré que certaines molécules organiques soufrées semblent intervenir dans le métabolisme lipidique. Ainsi, ELDJARN et PIHL (21) ont indiqué en 1957 que la cystéamine et ses dérivés comme la N-diacétylcystéamine, donnent des disulfures mixtes avec le glutathion réduit et d'une manière générale avec le groupe SH de certaines enzymes ou de certains vecteurs tels que le Coenzyme A ; or, on connaît l'importance du Co.A dans le métabolisme des lipides. Par ailleurs, SKREDE et CHRISTOPHERSEN (22) ont montré que la cystéamine seule stimule fortement la peroxydation des lipides mais, que si l'autoxydation du thiol est contrariée, la peroxydation n'a pas lieu.

Enfin, quelques expériences sur l'animal (expériences non publiées) nous ont montré que si la cystéamine seule est prosébogène, par contre, l'administration de certains de ses dérivés diminue, par exemple, chez le rat carencé en biotine, la sécrétion des lipides sébacés ; les images histologiques des glandes s'améliorent et redeviennent normales. Cependant, le mécanisme d'action de ces molécules nous était encore inconnu ; c'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier l'action de quelques dérivés soufrés sur le métabolisme lipidique cutané du rat.

Nous avons divisé notre travail en 4 parties :

La première partie est consacrée à l'étude de l'incorporation d'acide oléique 10-^{14}C dans les lipides cutanés du rat en présence ou non de dérivés soufrés. Au cours de cette étude, on met en évidence un ralentissement de la synthèse des lipides neutres par certains dérivés soufrés, ralentissement qui semble être dû à une inhibition de la phosphatidate phosphatase.

Dans la seconde partie, on vérifie par des études de cinétique enzymatique que les phosphatases acides épidermiques sont effectivement inhibées par certains dérivés soufrés dont nous comparons l'action par une étude de leur coefficient d'inhibition.

Sans une étude du renouvellement dans l'organisme de quelques dérivés soufrés dont certaines propriétés ont été mises précédemment en évidence, nous avons pensé que notre travail aurait été incomplet.

C'est pourquoi, dans un troisième temps, nous avons étudié la localisation, le métabolisme et l'élimination de deux molécules types : une de la série cystéine et une autre de la série cystéamine.

Enfin, nous avons cherché à localiser au niveau des organites subcellulaires épidermiques, le ou les site (s) de fixation de la benzyl thio-2-éthylamine ou de ses métabolites. Signalons que dans ce domaine d'investigation tout un travail de base était à réaliser, car nous ne disposions d'aucune technique de séparation satisfaisante des organites subcellulaires épidermiques (4ème partie) .

- 1ère Partie -

. INCORPORATION D'ACIDE OLEIQUE 10-^{14}C DANS LES LIPIDES CUTANES DU RAT EN PRESENCE OU NON DE DERIVES SOUFRES

Chapitre I

MATERIEL ET METHODES

On trouvera à la page 20 le tableau synoptique du protocole expérimental suivi (Figure 4).

1) CHOIX DES ANIMAUX

Toutes les expériences ont été effectuées in vivo puis in vitro sur des rats mâles de souche Wistar provenant de notre élevage, ce qui a permis de constituer des lots homogènes tant du point de vue génétique que d'âge. Ainsi, dans certaines expériences, les animaux avaient un poids de 250 ± 10 g et dans d'autres 200 ± 10 g . Nous nous sommes servis d'animaux, soit carencés en biotine depuis un mois, soit nourris normalement.

2) REPARTITION DES ANIMAUX ET EXPERIMENTATION IN VIVO

Dans chaque expérience, les rats sont répartis au hasard en plusieurs lots de 4 rats :

2-1 Lot 1

Ce lot constitue la série témoin. Dans ce groupe, les animaux sont nourris ad libitum avec le régime d'entretien ci-après :

- Céréales et produits hydrocarbonés ..... 53,5 %
- Issues et légumineuses ..... 25 %
- Tourteaux et Expellers ..... 6,5 %
- Farine d'origine animale ..... 8 %
- Activateurs de croissance ..... 3 %
- Composé minéralisé, vitaminisé ..... 4 %

Les garanties de ce régime sont les suivantes : 1.600 calories par kg.

. Humidité			12 %
. Matières minérales	7	%	
. Matières cellulosiques	6	%	
. Matières azotées	17,5	%	
. Matières grasses	3	%	
. Sucres, amidon	54,5	%	
	88	%	88 %
(D'après fiche technique U.A.R. n° 1.04)			100 %

2-2 Lot 2

Ce lot est constitué par des rats soumis à une période de jeûne de 72 h avant l'expérience in vitro. Cette longue période de jeûne permet d'éliminer la plus grande partie des lipides de réserve que l'on trouve au niveau du derme et d'éviter ainsi une trop grande dilution des lipides synthétisés lors de l'expérience in vitro. Remarquons que cette longue période de jeûne n'est pas très physiologique. Mais, en fait, nous n'avons pas cherché ici à étudier un phénomène de régulation mais un mécanisme d'action chimique.

2-3 Lot 3

Les animaux de ce lot, également soumis au jeûne de 72 h, reçoivent en outre, quotidiennement par voie orale (sonde oesophagienne), pendant cette période, un des dérivés soufrés dont on trouvera, par ailleurs, la liste et la nomenclature (page 21). Ces dérivés sont administrés à raison de 1,5 mM/kg/24 heures,en solution aqueuse,à un pH voisin de la neutralité,dans un volume de 1 ml.

2-4 Lot 4

Rats rendus séborrhéiques par carence en biotine depuis 1 mois. Aucun animal de laboratoire ne présente de séborrhée naturellement. Plusieurs techniques, cependant, permettent de créer des états séborrhéiques. Citons entre autre chez le rat la carence en biotine, les régimes alimentaires chargés en esters d'alcool de poids moléculaire élevé et fortement insaturés comme l'oléate d'oléyle ou l'huile de spermaceti.

Citons encore les traitements par androgènes. Parmi toutes ces techniques, nous avons retenu la carence en biotine qui donne des lésions bien caractéristiques et permet de suivre facilement l'évolution d'un traitement. Les rats de ce groupe sont nourris ad libitum dès le sevrage et pendant 1 mois avec le régime ci-après. (Régime pour carence en biotine chez le rat selon la formule GRAM - OKEY - Fiche U.A.R. 2.12).

- Caséine dévitaminisée délipidée ..... 5 %
- Albumine d'oeuf ..... 15 %
- Huile de noix de coco ..... 10 %
- Saccharose ..... 66 %
- Complexe minéral U.S.P. XIV ..... 4 %
- Vitamines (sans biotine, sans pyridoxine) ..... +

A ce régime, on ajoute 0,5 % de sulfathiazol.

Composition en vitamines de ce régime :

. Vitamine A	19.800	UI/kg	. Vitamine B12	0,05	mg/kg
. Vitamine D	6.000	UI/kg	. Vitamine E	170	mg/kg
. Vitamine B1	0,08	mg/kg	. Vitamine K	40	mg/kg
. Vitamine B2	15	mg/kg	. Vitamine PP	100	mg/kg
. Vitamine B3	70	mg/kg	. Vitamine Choline	1.300	mg/kg
. Vitamine B7	150	mg/kg	. Vitamine Folique	5	mg/kg

L'albumine de l'oeuf par l'avidine qu'elle contient évite l'absorption intestinale de la biotine. Le sulfathiazol détruit la flore intestinale du rat capable de synthétiser la vitamine H. Enfin, on supprime également la vitamine B6 dans le régime car la pyridoxine peut dans certains cas compenser les effets de la carence en biotine.

Cette carence en biotine provoque une hypersécrètion de lipides épicutanés et, en même temps, on observe une nette alopécie. L'examen histologique de la peau révèle chez ces rats carencés des glandes sébacées nettement hypertrophiées avec hyperplasie et hypertrophie cellulaires. On observe des cellules volumineuses avec un rapport nucléocytoplasmique modifié.

Les noyaux deviennent pycnotiques et même disparaissent en même temps que les granules lipidiques envahissent peu à peu la cellule jusqu'à en occuper la quasi totalité et même parfois jusqu'à la faire éclater.

2-5 Lot 5

Rats carencés en biotine depuis 1 mois et traités par un des dérivés soufrés administrés per os dans les mêmes conditions que pour le lot 3 pendant les 72 heures précédant l'expérience in vitro.

2-6 Lot 6

Rats carencés en biotine depuis 1 mois, mis à jeun 72 heures avant l'expérience in vitro.

2-7 Lot 7

Rats carencés en biotine depuis 1 mois, mis à jeun 72 heures avant l'expérience in vitro et traités per os par un des dérivés soufrés comme dans le cas des rats du lot 3.
Pendant la période de 72 heures, les animaux à jeun ont libre accès à l'eau de boisson.

3) EXPERIENCE IN VITRO

Les animaux étant sacrifiés par décapitation, la région dorsale rétroscapulaire est tondue puis lavée à l'alcool ; on prélève alors 16 cm2 de peau sur chaque rat dans cette région : chaque échantillon débarrassé du panicule musculaire et adipeux sous-cutané et fragmenté en petits morceaux est introduit dans un tube à incubation contenant 10 ml de Tampon Krebs-Ringer-Phosphate (K.R.P.) de pH 7,4 :

. NaCl	0,90 %	0,154 M	100 volumes
. KCl	1,55 %	0,154 M	4 volumes
. CaCl2	1,22 %	0,110 M	3 volumes
. $MgSO_4$ $7H_2O$	3,82 %	0,154 M	1 volume
. Tampon phosphate	.....	0,1 M - pH 7,4 -	20 volumes

A chaque tube on ajoute 0,1 % d' α glycérophosphate de sodium, 10 % de sérum de rat et 5 µCi d'oléate de sodium préparé par nos soins à partir d'acide oléique 10-^{14}C dont l'activité spécifique est 21 mCi/mM (C.E.A. SACLAY-FRANCE).

Dans les tubes correspondant aux rats ayant reçu per os des produits soufrés, on ajoute 5.10^{-4}M de dérivé soufré. L'incubation est réalisée à 37°C sous agitation pendant 3 heures en utilisant l'air comme phase gazeuse. L'expérience se déroule dans des conditions stériles.

Aussitôt, après incubation, les fragments tissulaires sont refroidis rapidement à + 4° C, lavés 3 fois dans 20 ml de tampon K.R.P. à 0° C et réunis par série.

4) EXTRACTION PURIFICATION DES LIPIDES TOTAUX

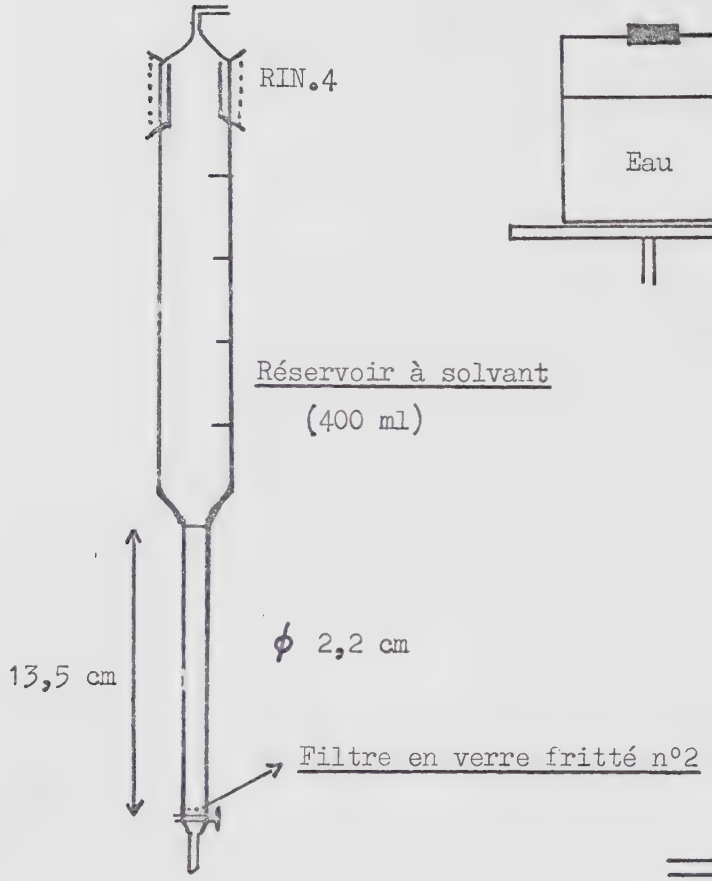
Pour extraire et purifier les lipides totaux cutanés, nous avons retenu la méthode de FOLCH selon DAWSON (23), technique utilisée couramment pour extraire les lipides des tissus animaux. Les morceaux de peau sont recueillis dans un mélange de Chloroforme/Méthanol 2v/1v de manière à les diluer 20 fois.

On agite une nuit à 4° C puis on filtre. Les tissus sont repris par le mélange Chloroforme/Méthanol 2/1 et broyés dans un mortier avec du sable de Fontainebleau. On filtre et on ajoute le nouveau filtrat au filtrat précédent. Le filtrat total est alors mélangé avec le 1/5 de son volume en eau dans une ampoule à décanter. On agite et on laisse reposer 2 heures. On recueille la phase inférieure et l'interphase. Cette dernière contient des lipides et des impuretés hydrosolubles. On procède alors à 3 lavages de cette interphase avec quelques millilitres d'un mélange Chloroforme/Méthanol/Eau 3/48/47 doucement sans perturber la phase inférieure. On élimine par siphonage ces liquides de rinçage. Peu à peu, l'émulsion de l'interphase disparait, les lipides étant entrainés dans la phase inférieure chloroformique, les impuretés étant éliminées avec les lavages aqueux. Avec le mélange Chloroforme/Méthanol 2/1 on ramène à une seule phase, la phase inférieure et le liquide de rinçage résiduel.

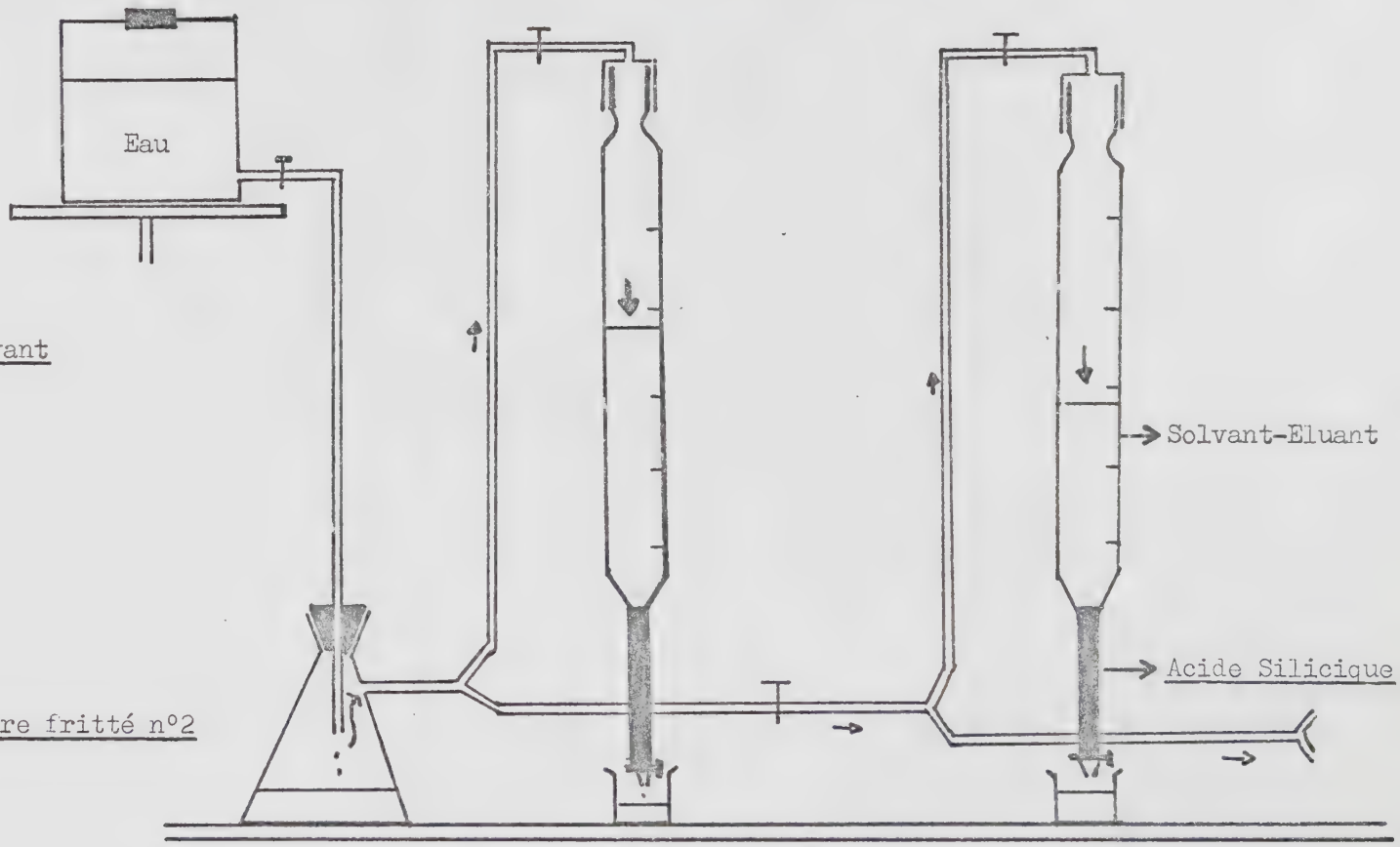
5) SEPARATION DES LIPIDES TOTAUX EN LIPIDES NEUTRES et PHOSPHOLIPIDES

Des techniques simples de chromatographie sur colonne permettent de séparer rapidement des mélanges de lipides. Pour fractionner l'extrait lipidique total en lipides neutres et phospholipides, nous avons employé la méthode de MARINETTI (24).

FIGURES 3



COLONNE POUR CHROMATOGRAPHIE



CREATION D'UNE PRESSION ARTIFICIELLE AU-DESSUS DU SOLVANT-ELUANT

On remplit une colonne de 2,2 cm de diamètre et d'une hauteur de 13,5 cm avec 32 g d'acide silicique Mallinckrodt 100 Mesh (Figure 3) que l'on met en suspension dans 200 ml de méthanol. On agite alors le tout vigoureusement de manière à avoir une suspension bien homogène. On ouvre le robinet à la base de la colonne de temps en temps pour éviter toute surpression. La colonne est ensuite placée sur son support et on laisse filtrer le méthanol. On fait ensuite passer du chloroforme jusqu'à ce que l'aspect de la colonne soit translucide ; on obtient ainsi une colonne bien homogène, sans bulles et correctement débarrassée des produits solubles dans le méthanol et le chloroforme. Une fois le lavage chloroformique terminé (en ayant soin de laisser 1 ml de solvant au sommet de la colonne pour éviter son dessèchement), on dépose les lipides totaux en solution dans le minimum de chloroforme sur l'acide silicique à l'aide d'une seringue munie d'un fin capillaire qui viendra affleurer la surface du gel.

Les lipides neutres sont élués par 350 à 400 ml de chloroforme. Les phospholipides restent adsorbés sur le gel de silice. Ils sont ensuite élués par 350 à 400 ml de méthanol.

Le débit est réglé à la cadence de 1 goutte toutes les 2 secondes à l'aide d'un système de pression dont le montage simple est illustré par la figure 3. On obtient ainsi les lipides totaux séparés en lipides neutres et phospholipides.

6) SEPARATION DES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES

Le but poursuivi est d'isoler correctement les monoglycérides, diglycérides, triglycérides, cholestérol et esters du cholestérol afin de suivre l'incorporation de l'oléate dans chacun des constituants des lipides neutres. Or, au cours d'expériences préliminaires, nous avons constaté que la fraction triglycérides après fractionnement des lipides neutres sur colonne d'acide silicique était invariablement contaminée par de l'acide oléique 10-^{14}C. Il était donc important de séparer préalablement les acides gras des lipides neutres considérés dans leur ensemble avant d'entreprendre un fractionnement plus complet.

6-1 Première méthode

Nous avons essayé, dans un premier temps, d'éliminer les acides gras par lavages successifs avec une solution diluée de soude ou de triéthanolamine.

Dans cette expérience, on ajoute à 200 mg de lipides neutres cutanés de rat 0,1 µCi d'acide oléique 10-^{14}C, puis on reprend ces lipides par 5 ml d'éther et on neutralise par de la soude ou de la triéthanolamine à 5 % dans de l'alcool à 70°. Après décantation, on recueille le surnageant. Ce lavage est reconduit 10 fois, et, à chaque étape, l'activité d'une aliquote du surnageant est déterminée. Si la décroissance d'activité est bien constante pendant les premiers lavages, au-delà du 6ème lavage, il n'est plus possible d'éliminer les acides gras résiduels. Cette méthode n'ayant donc pas donné satisfaction, nous avons retenu le protocole expérimental suivant :

6-2 Deuxième méthode

Les lipides non phosphorés sont débarrassés des acides gras libres, par 2 passages successifs sur colonne d'alumine avec élution à l'éther hydraté (25). L'alumine employée est de l'aluminoxid standardisert Merck. Après lavage de la colonne à l'éther hydraté, les lipides neutres en solution dans le minimum d'éther hydraté sont déposés à son sommet selon la méthode précédemment décrite. L'élution des lipides avec 400 ml d'éther hydraté permet une récupération quantitative des lipides neutres à l'exception des acides gras qui sont adsorbés sélectivement sur la colonne d'alumine. Ces derniers peuvent être élués avec du méthanol ou de l'éther additionné d'acide acétique.

Cette opération répétée très lentement 2 fois permet de débarrasser les lipides neutres des acides gras libres qui les contaminent. Les figures 6 et 7 page 27 illustrent bien cette séparation.

7) FRACTIONNEMENT DES LIPIDES NEUTRES SANS ACIDES GRAS .

Une nouvelle chromatographie sur colonne d'acide silicique selon BARRON (26) permet d'obtenir séparés les divers constituants des lipides neutres : l'acide silicique est lavé successivement à l'éther, à l'hexane contenant 15 % de benzène, puis à l'hexane.
Les lipides neutres sans acides gras sont adsorbés par l'acide silicique en milieu hexane ; on élue successivement :

. les carbures aliphatiques par de l'hexane (200 ml)
. les cires et les esters de stérols par du benzène à 15 % dans l'hexane (200ml
. les triglycérides par de l'éther éthylique à 10 % dans l'hexane (350 ml)
. le cholestérol libre par de l'éther éthylique à 20 % dans l'hexane (300 ml)
. les mono et diglycérides par de l'éther éthylique (200 ml)

8) FRACTIONNEMENT DES PHOSPHOLIPIDES

L'analyse chromatographique des phospholipides est effectuée suivant la méthode de PAYSANT-DIAMENT (27).

L'acide silicique est lavé successivement par du méthanol, de l'éther de pétrole et du chloroforme. Les phospholipides sont repris par le minimum de chloroforme/méthanol 2/1 et déposés selon la manière décrite précédemment à la surface du gel. On élue successivement par les mélanges suivants :

. 300 ml de chloroforme éliminent les lipides neutres résiduels.
. 300 ml de chloroforme/méthanol 15/1 éluent les acides phosphatidiques.
. 300 ml de chloroforme/méthanol 12/1 éluent les phosphatidyléthanolamines.
. 300 ml de chloroforme/méthanol 7/1 éluent les lysophosphatidylsérines les lysophosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines.
. 300 ml de chloroforme/méthanol 3/2 puis 5/4 éluent les phosphatidylcholines et les sphingomyélines
. 300 ml de méthanol éluent les lysocithines et les lysolécithines.

Des chromatographies réalisées avec des surcharges d'acide oléique 10-^{14}C et de la trioleine 10-^{14}C ont permis de contrôler que, dans ces conditions expérimentales, les fractions ci-dessus ne sont pas contaminées par des traces de lipides neutres ou d'acides gras libres.

9) ANALYSE DES DIFFERENTES FRACTIONS

A chacune de ces étapes, on procède à un certain nombre d'examens et de manipulations.

9-1 Evaporation à sec des échantillons

On évapore à sec les différents constituants des lipides obtenus après chaque séparation. Les solvants étant tous organiques et facilement volatils, un séjour de 2 à 3 heures, sous une hotte convenablement ventilée, a suffi dans la plupart des cas à obtenir des lipides secs.

Cependant, dans le cas où il y avait des traces d'eau (en particulier, au niveau des phospholipides), une évaporation sous vide partiel à l'évaporateur rotatif avec léger chauffage (40°C) a été parfois nécessaire.

9-2 Détermination du poids sec des échantillons

Le poids sec total de chaque fraction recueillie est déterminé par double pesée ; cependant dans quelques cas, la quantité de lipides étant très faible, le poids sec de certains échantillons a été évalué par spectrophotocolorimétrie selon la méthode de COTTET-ETIENNE (104) :

"DOSAGE DES LIPIDES PAR LA METHODE SULFOPHOSPHOVANILLIQUE" :

Les lipides donnent après action de l'acide sulfurique à chaud et de l'acide phosphorique une coloration rose à la vanilline.

La gamme étalon est effectuée à partir d'une solution contenant 1 mg de lécithines par millilitre de chloroforme/méthanol 2/1. Après évaporation complète des solvants on ajoute goutte à goutte 5 ml d'acide sulfurique (d = 1,841) puis on place les tubes 10 minutes au bain-marie bouillant ; on ajoute ensuite à une aliquote de 0,2 ml, 3,8 ml d'acide orthophosphorique (d = 1,70) puis 1 ml d'une solution de vanilline à 0,6 % dans de l'eau distillée. Après un séjour de 10 minutes à l'obscurité on lit la DO des solutions de lipides colorées à 525 nm contre un témoin des réactifs qui a reçu 1 ml d'eau distillée au lieu de 1 ml de la solution vanillique.

Ces mesures permettent ensuite de réaliser les dilutions souhaitées au cours des analyses successives, de déterminer le rendement des chromatographies sur colonne et de rapporter l'activité de l'oléate incorporé par mg de lipides.

9-3 Contrôle de la pureté des fractions par chromatographie en couche mince

Ces dernières années, la chromatographie sur couche mince d'acide silicique a permis d'effectuer de bonnes séparations des divers constituants lipidiques. Cette technique permet de contrôler la pureté des diverses fractions isolées par chromatographie sur colonne.

On dépose à la base du chromatogramme à 2 cm des bords : 0,1 ou 1 mg de substance en solution dans du chloroforme ou du méthanol, en spot de 5 mm de diamètre ou en ligne de 1 cm à l'aide d'une micro-pipette. Les chromatoplaques utilisées sont des feuilles KODAK K 301 V d'acide silicique sans indicateur fluorescent. Parallèlement aux produits à contrôler, on fait migrer des substances étalons correspondantes.

Les chromatoplaques sont ensuite placées dans des cuves hermétiquement bouchées, saturées depuis la veille par le mélange éluant et sont alors soumises à une chromatographie ascendante sur une hauteur de 10 à 12 cm.

Le mélange éluant utilisé pour les lipides neutres est celui décrit par SOULA (28) :

(éther de pétrole, éther sulfurique, acide acétique (80/20/1)

et pour les phospholipides, celui décrit par SINGH (29) :

(chloroforme, méthanol, ammoniaque 6 N -(65/30/5).

Avant révélation, les chromatogrammes sont laissés sous hotte à température ambiante jusqu'à évaporation complète des solvants.

9-4 Révélation des chromatogrammes

Pour déceler les lipides sur les chromatogrammes, nous avons employé une révélation à l'iode pour les lipides neutres et différents essais de coloration pour les phospholipides.

9-4-1 Révélation du phosphore des phospholipides

Le phosphore des phospholipides est mis en évidence selon la méthode de COULON-MORELEC (30). On pulvérise sur le chromatogramme un réactif au molybdate d'ammonium (3 g) dissous dans 25 ml d'eau et additionné de 30 ml d'acide chlorhydrique (N) et de 15 ml d'acide perchlorique concentré. Après 20 minutes à l'étuve à 105 ° C, les lipides phosphorés apparaissent en bleu sur un fond gris.

9-4-2 Révélation des phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines

Les fonctions aminées libres des phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines sont révélées par pulvérisation sur le chromatogramme d'une solution de ninhydrine à 0,2 % dans un mélange butanol - acide acétique à 10 % 95/5 . Après 20 minutes à 105 ° C, les amines se révèlent en violet avec une grande sensibilité.

9-4-3 Révélation des phosphatidylcholines

Pour révéler les composés choliniques, on pulvérise sur le chromatogramme un mélange préparé extemporanément de 20 ml d'une solution de sous nitrate de bismuth à 1,7 % dans l'acide acétique à 20 % avec 5 ml d'une solution aqueuse d'iodure de potassium à 40 %, ce mélange étant complété par 70 ml d'eau. Les phosphatidylcholines donnent des taches ocres après pulvérisation de ce réactif sur le chromatogramme.

Les spots ainsi localisés sont soigneusement entourés et les Rf sont déterminés en calculant le rapport hauteur de migration du spot calculée à sa base sur hauteur de migration du solvant.

9-5 Autoradiographies

Cette technique a été mise au point par ULLBERG (31) (32), décrite par BOYD (33) - PELLERIN (34), ZADJELLA (35).
Des numéros et des repères sont tracés sur les chromatogrammes avec de l'encre de chine radioactive (20 μCi de toluène-^{14}C pour 5 ml d'encre) pour pouvoir faire coïncider exactement après révélation chromatogramme et autoradiographie.

En chambre noire, les chromatogrammes sont mis en contact de la face sensible de films à rayons X (Films KODIREX de KODAK). L'ensemble, remis dans l'enveloppe du film pour éviter tout passage de lumière, est ensuite placé dans une presse pour augmenter le contact chromatogramme-film. Les temps d'exposition varient avec la quantité de radioactivité présente sur la plaque et sa répartition sur le chromatogramme. Ils sont approximativement de 10 jours.

Après un temps d'exposition convenable, les films sont développés à l'aide du révélateur KODAK DX 80. Le temps de révélation varie avec la température du bain. L'image est fixée à l'aide du fixateur KODAK FX 40-X-RAY pendant une durée de 15 à 20 minutes. Les films sont rincés abondamment à l'eau courante pendant 1 à 2 heures et séchés à température ambiante.

9-6 Mesure de la radioactivité dans chaque échantillon

La mesure de la radioactivité dans chaque échantillon des lipides à analyser est effectuée par la technique de la scintillation liquide. On dépose 5 à 10 mg de lipides à analyser, dissous dans du toluène, dans des flacons de verre à faible teneur de ^{40}K . Ces flacons sont munis d'un bouchon garni intérieurement d'un joint de liège aluminium. Avant introduction du mélange scintillant, les échantillons colorés doivent être, si l'opération est possible, décolorés au thiosulfate de sodium ou à l'eau oxygénée. Cette opération est nécessaire car les substances colorées comme les phospholipides diminuent l'efficacité du comptage. A ces lipides, en solution dans le toluène, on ajoute 15 ml du mélange scintillant, ainsi constitué :

. PPO (2,5 diphényloxazol)		5 g
. Diméthyl POPOP (1,4 bis -2- (4 Méthyl 5 Phényloxazolyl)benzol)		100 mg
. Toluène	q.s.p.	1 litre

La mesure de l'activité des échantillons ainsi préparés est effectuée à l'aide du compteur à scintillation Tritomat IDL Elliot Automation. La tension appliquée aux bornes des photomultiplicateurs est respectivement de 1040 volts et 1120 volts. Ces tensions sont caractéristiques des photomultiplicateurs et ont été déterminées en traçant la courbe cpm = f (v) pour une série d'échantillons de toluène ^{14}C étalon.

Les tensions choisies correspondent aux maxima des courbes. La durée du comptage est variable selon l'activité contenue dans les échantillons ; elle peut varier de 1 minute à 60 minutes. Le bruit de fond de l'appareil est 2 à 3 cps dans ces conditions expérimentales.

Le rendement de chaque mesure est déterminé par la méthode de standardisation interne qui consiste à placer dans un flacon dont l'activité vient d'être déterminée, une quantité voisine de toluène - ^{14}C étalon. La radioactivité de ce flacon est de nouveau déterminée et le calcul suivant permet d'établir le rendement du comptage :

- soit x le nombre de coups par seconde trouvé au premier passage ;
- soit x' le nombre de désintégrations par seconde rajouté à ce même flacon après première lecture.

La seconde lecture devrait donner y coups par seconde = x + x' pour un rendement de 100 %.

La lecture du nombre de coups trouvés après seconde lecture permet à partir de y calculé et par une simple règle de trois de déterminer le rendement de chaque mesure et à partir de ces chiffres de passer des coups enregistrés par seconde (cps) aux désintégrations par seconde (dps).

9-7 Mesure de la radioactivité à partir des chromatogrammes

Après autoradiographie des chromatogrammes où 1 mg de substance a été déposée et identification des différentes zones radioactives, on prélève ces dernières par grattage.
La poudre (acide silicique plus lipides) ainsi recueillie est directement placée dans le flacon de comptage.

Les lipides sont dissous dans le mélange scintillant par agitation et après repos de plusieurs heures à + 4° C, la radioactivité de chaque échantillon est déterminée par scintillation liquide.

Figure 4 → Schéma du PROTOCOLE EXPERIMENTAL

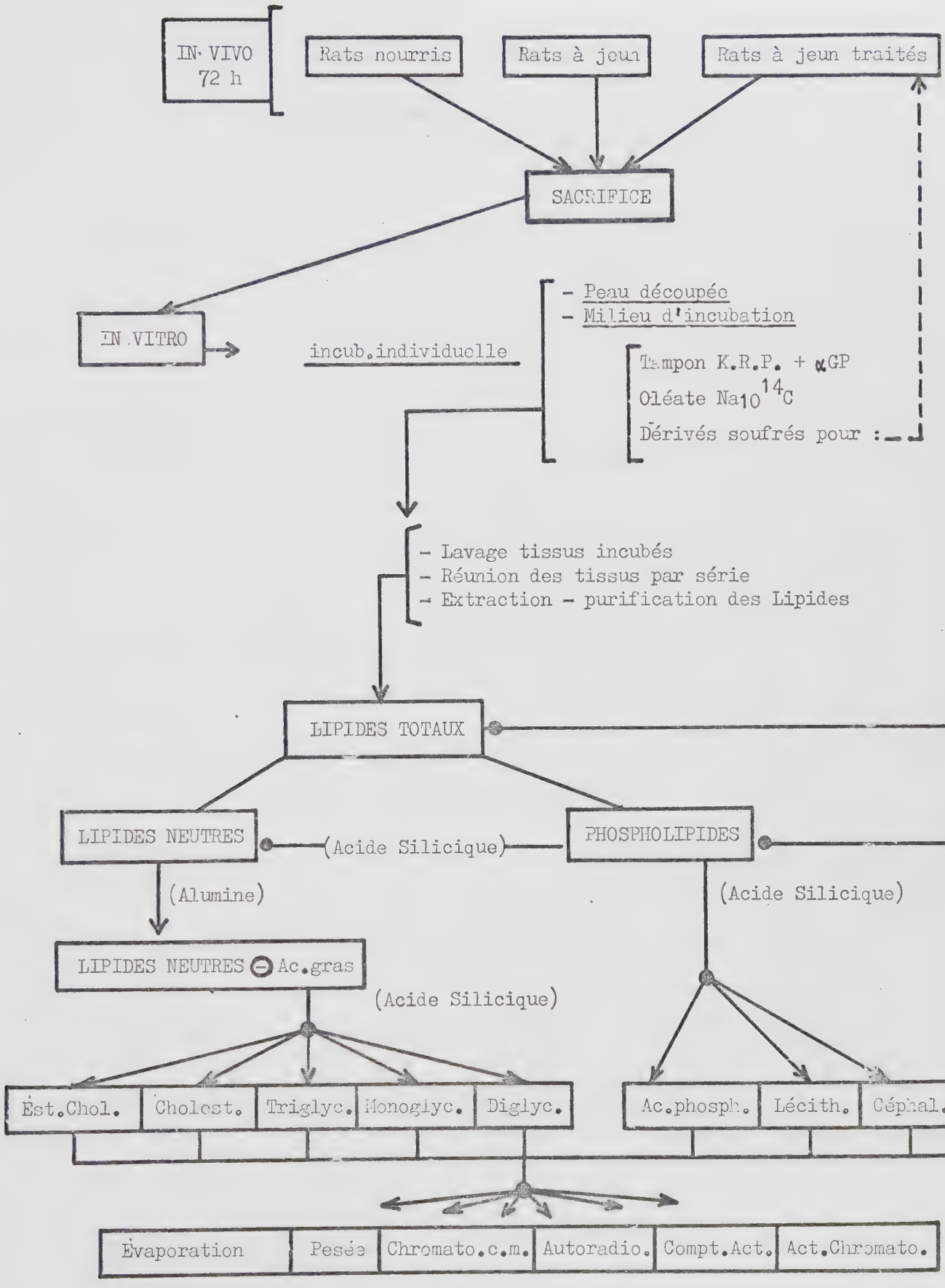
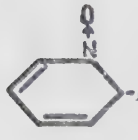


FIGURE 5

NOMENCLATURE DES SUBSTANCES ETUDIEES (36)

- $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH_2$, HCl Chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine
- $HS-CH_2-CH_2-NH_2$ Thio-2-éthylamine (cystéamine)
-  Pyridine N-oxyde-S-cystéine
- $CH_3-O-CO-CH_2-S-CH_2-CH(COOH)(NH_2)$ S-Méthoxycarbonylméthyl-L-cystéine
- $HS-CH_2-CH(COOH)(NH_2)$, HCl Chlorhydrate de cystéine
- $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH_2$, $HOOC-CHOH-CH_2-COOH$

  Malate de benzyl thio-2-éthylamine
- $\left\{ \text{ } -CH_2-S-CH_2-CH_2-NH_2 \right\}_2$, $HOOC-CHOH-CHOH-COOH$

  Tartrate de benzyl thio-2-éthylamine
- $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH_2$, $HOOC-CH_2-S-CH_2-CH(COOH)(NH_2)$

  Carboxyméthylcystéinate de benzyl thio-2-éthylamine

Chapitre II

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1) INCORPORATION CUTANEE D'OLEATE DE SODIUM 10-^{14}C CHEZ LES RATS SAINS NOURRIS NORMALEMENT, A JEUN ET A JEUN TRAITES AU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO 2 ETHYLAMINE (BTE)

Après traitement in vivo des animaux puis incorporation in vitro d'oléate de sodium 10-^{14}C dans les lipides cutanés, nous avons donc fractionné ceux-ci en leurs principaux constituants. Nous avons enregistré les résultats suivants :

Tableau I

Incorporation d'acide oléique 10-^{14}C dans les lipides cutanés de rats nourris, à jeun, à jeun traités : bien que les quantités de lipides obtenus chez les rats à jeun soient nettement plus faibles que chez les rats nourris, les proportions de lipides neutres et de phospholipides restent identiques dans les diverses séries expérimentales : de l'ordre de 4 % dans les phospholipides et de l'ordre de 85 % pour les lipides neutres. Ce premier résultat suggère que l'effet du jeûne a retenti sur l'ensemble des lipides et non sur une catégorie particulière.

On retrouve dans les lipides cutanés une activité correspondant à une incorporation effective d'acide oléique ainsi qu'en témoignent les figures 6 et 7 ; celles-ci ainsi que les résultats consignés sur le tableau I montrent que les lipides lavés contiennent une fraction importante d'acide oléique libre régénéré à partir de l'oléate de sodium au cours de l'expérience in vitro, alors que le passage sur alumine a permis de le retenir en totalité.

	LIPIDES TOTAUX		LIPIDES SANS ACIDES GRAS LIBRES		PHOSPHOLIPIDES		LIPIDES NEUTRES	
	Poids (mg)	Act.totale (dps)	Act.totale (dps)	Act.spéc. (dps/mg)	%	Act.spéc. (dps/mg)	%	Act.spécifique (dps/mg)
RN	352	62.200	6.300	17,8	3,9	85	84,1	14,2
RJ	229	79.900	7.650	33,4	5,25	83	87,0	33,0
RJ+BTE	247	99.000	5.950	23,1	4,0	216	85,4	14,6

- INCORPORATION D'ACIDE OLEIQUE 10-^{14}C DANS LES LIPIDES CUTANES DE RATS NOURRIS NORMALEMENT (RN), A JEUN DEPUIS 72 H (RJ) ET A JEUN TRAITES A LA BENZYL THIO 2 ETHYLAMINE (RJ + BTE) -

TABLEAU I

Au niveau des phospholipides, on observe une forte augmentation de l'incorporation d'acide oléique chez les rats traités au BTE alors qu'il n'y a pas de différence entre rats nourris et rats à jeun non traités avec le BTE. L'activité spécifique des phospholipides est en effet de 216 dps/mg chez les rats à jeun traités au BTE ; elle n'est que de 83 dps/mg chez les rats à jeun et de 85 dps/mg chez les rats nourris.

L'activité spécifique des lipides neutres augmente considérablement chez les rats à jeun (33,0 dps/mg) par rapport aux rats nourris (14,2 dps/mg). Par contre, chez les animaux à jeun traités avec le BTE, le taux d'incorporation (14,6 dps/mg) est voisin de celui obtenu chez les rats nourris. Les rats à jeun et les rats à jeun traités ont donc répondu différemment à l'incorporation d'acide oléique.

Tableau II

Ces résultats ne sont pas le fait du hasard, les expériences ayant été répétées à plusieurs reprises avec les mêmes résultats bien qu'il existe d'importants écarts. Ces écarts sont dûs aux variations individuelles et au fait que selon les expériences étalées sur toute une année, l'effet du jeûne peut ne pas être identique.

Cependant, on constate que par rapport aux rats à jeun, les rats à jeun traités par le BTE ont toujours présenté des taux d'incorporation plus élevés dans les phospholipides et plus faibles dans les lipides neutres.

Si on compare maintenant les taux d'incorporation des rats à jeun traités par le BTE par rapport à ceux obtenus chez les rats nourris, on remarque qu'au niveau des lipides neutres, les variations n'excédent jamais 10 % ce qui pourrait correspondre à une action du BTE sur certains mécanismes de régulation.

Tableau III

L'analyse des lipides neutres en chromatographie en couche mince ou en séparation sur colonne, met en évidence une incorporation importante dans les triglycérides. Les variations obtenues dans les triglycérides reflètent donc ce que l'on a observé sur les lipides neutres considérés dans leur ensemble, à savoir que les rats nourris et les rats à jeun traités avec le BTE montrent une même activité spécifique (10,2 dps/mg pour les rats nourris et 10,1 dps/mg pour les rats à jeun + BTE) nettement plus faible que celle observée chez les rats à jeun non traités (36 dps/mg).

		1ère exp.	2ème exp.	3ème exp.	4ème exp.	5ème exp.
$\frac{AS.rats(J+BTE) - AS.rats\ (J)}{AS.rats\ (J)} \times 100$	PL	+ 123 %	+ 160 %	+ 56 %	+ 76 %	+ 48 %
	LN	- 72 %	- 56 %	- 76 %	- 40 %	- 31 %
$\frac{AS.rats(J+BTE) - AS.rats\ (N)}{AS.rats\ (N)} \times 100$	LN	0 %	+ 2,8 %	- 5,1 %	- 10 %	+ 10 %

(AS = Activité Spécifique) - (LN = Lipides Neutres) - (PL = Phospholipides) - (J = Jeun) - (N = Nourris)

- VARIATIONS DES TAUX D'INCORPORATION D'ACIDE OLEIQUE 10-^{14}C IN VITRO DANS LA PEAU DE RATS NOURRIS ET DE RATS A JEUN TRAITES OU NON PAR LE CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE -

TABLEAU II

A) ACTIVITE TOTALE DES DIFFERENTES FRACTIONS APRES CHROMATOGRAPHIE COUCHE MINCE DE 1 mg DE LIPIDES NEUTRES - AG (DPS)

Rats nourris				Rats à jeun				Rats à jeun + BTE			
TG + C	AG	MDG	R	TG + C	AG	MDG	R	TG + C	AG	MDG	R
6,6	1	2	1,3	20,6	1	1,7	1,0	5,3	1	2,3	3,6

B) REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE DANS LES LIPIDES NEUTRES APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE POUR UNE MEME QUANTITE INCLUSE (190 mg) ET UN RENDEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE 87 %

	Rats nourris			Rats à jeun			Rats à jeun + BTE		
	C	TG	MDG	C	TG	MDG	C	TG	MDG
• Poids (mg)	18	121	34	26,5	13	29	16	119	34,6
• Activité totale (dps)	44	1 240	800	114	4 50	686	48	1 200	690
• Act.spécifique (dps/mg)	2,4	10,2	23,4	4,3	36	23,7	3	10,1	19,6

(TG = Triglycérides) - (C = Cires) - (AG = Acides gras) - (MDG = Mono et diglycérides) - (R = Reste)

ANALYSE DES LIPIDES NEUTRES

TABLEAU III

FIGURE 6

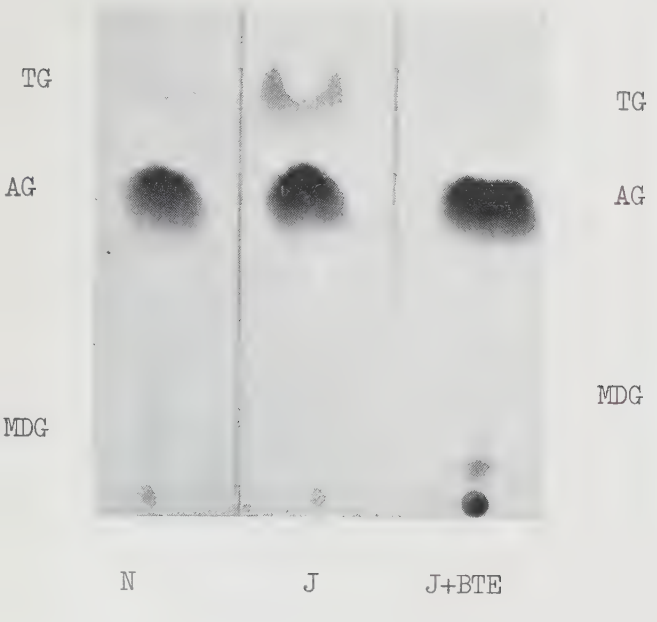


FIGURE 7

FIGURE 8

- FIGURE 6 AUTORADIOGRAPHIE DES LIPIDES NEUTRES AVANT PASSAGE SUR COLONNE D'ALUMINE
- FIGURE 7 AUTORADIOGRAPHIE DES LIPIDES NEUTRES APRES PASSAGE SUR COLONNE D'ALUMINE
- FIGURE 8 AUTORADIOGRAPHIE DES TRIGLYCERIDES ISOLES DES LIPIDES NEUTRES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

On peut noter en considérant d'une part le tableau III et d'autre part la figure 8, que l'intensité des taches des triglycérides dans les différentes séries est bien en rapport avec l'activité spécifique trouvée au niveau de ces triglycérides pour les séries correspondantes : l'intensité de la tache triglycérides chez les rats normaux (activité spécifique 10,2) est identique à l'intensité de la tache triglycérides des rats à jeun traités au BTE (activité spécifique 10,1) et celles-ci sont beaucoup moins sombres que la tache des triglycérides des rats à jeun dont l'activité spécifique est de 36 dps/mg.

On peut donc supposer qu'il y a inhibition de la synthèse des triglycérides sous l'effet du BTE.

L'activité obtenue dans les fractions cires est plus faible que dans les triglycérides ; cependant, on observe les mêmes variations. Ceci est intéressant puisque les cires se retrouvent surtout au niveau épidermique et sébacé chez le rat (37).

Quant aux mono et diglycérides, il n'y a pas d'écart significatif entre les résultats obtenus dans les 3 séries.

Tableau IV

Le tableau IV fait état de l'activité trouvée dans les différents phospholipides.

Des contrôles par chromatographies en couche mince suivis d'autoradiographies des diverses fractions obtenues après séparation sur colonne du pool de phospholipides ont montré que la quantité de "dérivés lyso" dans les fractions était extrêmement faible. Cependant, ne pouvant déterminer si ces derniers corps étaient des produits naturels ou des produits de dégradation nous avons regroupé certaines fractions. Les résultats rapportés dans le tableau IV A ont donc trait d'une part à la fraction chloroforme/méthanol 15/1 (fraction qui contient les acides phosphatidiques), d'autre part aux fractions chloroforme/méthanol 12/1, 7/1 et 4/1 (fractions qui contiennent les phosphatidyléthanolamines, phosphatidylsérines et leurs "dérivés lyso" éventuels), enfin aux fractions chloroforme/méthanol 3/2 5/4 et à la fraction méthanol (fractions contenant les phosphatidylcholines et lysophosphatidylcholines).

	RATS NOURRIS			RATS A JEUN			RATS A JEUN + BTE		
	Poids (mg)	A.T (dps)	A.S (dps/mg)	Poids (mg)	A.T (dps)	A.S (dps/mg)	Poids (mg)	A.T (dps)	A.S (dps/mg)
Fraction C/M 15/1 contenant les acides phosphatidiques	3,53	1 385	394	4,76	1 565	329	4,98	1 900	381
Fractions C/M 12/1 7/1 et 4/1 contenant les phosphatidyléthanolamines, phosphatidylsérines et leurs "dérivés lyso"	8,06	145	18	10,84	194	18,5	11,27	820	72,5
Fractions C/M 3/2 et 5/4 et fraction méthanol contenant les phosphatidylcholines et les lysophosphatidylcholines	11,80	295	25	19,47	381	31	7,28	465	64

AS = Activité Spécifique AT = Activité Totale C/M = Chloroforme/Méthanol

- VARIATIONS DES TAUX D'INCORPORATION D'ACIDE OLEIQUE 10-^{14}C DANS LES DIVERSES CATEGORIES DE PHOSPHOLIPIDES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE SELON LA TECHNIQUE DE PAYSANT-DIAMENT (27)

TABLEAU IV - A

RF	Révélations			Identification	Rats nourris (dps)	Rats à jeun (dps)	Rats à jeun+BTE (dps)
	Phosphore	Ninhydrine	S.nitr. bismuth				
0,85	+	+	±	Phosphatidyléthanolamines	26	17	40
0,80	±	-	+++	Phosphatidylchclines	16,5	20	46
0,70	+	+	±	Phosphatidylsérines			

- ACTIVITE (Dps) DES DIFFERENTES FRACTIONS APRES CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES PHOSPHOLIPIDES (-) LA FRACTION CHLOROFORME/METHANOL 15/1

. Les différents phospholipides ont été identifiés sur les chromatogrammes avant détermination de leur activité selon les méthodes exposées à la page 17.

. Les phosphatidylsérines étant peu marquées sur les autoradiogrammes, nous avons regroupé avant comptage les zones des chromatogrammes correspondant aux phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines.

TABLEAU IV - B

L'analyse des phospholipides tant après chromatographie sur couche mince qu'après séparation sur colonne d'acide silicique met en évidence une incorporation élevée d'acide oléique chez les rats à jeun traités avec le BTE par rapport aux rats à jeun et aux rats nourris dans les fractions phosphatidylcholines, phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines. L'analyse des phospholipides après séparation sur colonne d'acide silicique montre que dans la fraction 15/1 contenant les acides phosphatidiques, on retrouve l'acide oléique incorporé dans des proportions identiques dans les trois lots de rats. Ces premiers résultats semblent indiquer que le BTE provoque un blocage dans la chaîne de synthèse des triglycérides et une déviation métabolique vers une synthèse accrue de phosphatidylcholines, phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines.

2) INCORPORATION CUTANEE D'OLEATE DE SODIUM 10-^{14}C CHEZ LES RATS CARENCES EN BIOTINE - CARENCES EN BIOTINE TRAITES AVEC LE CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE (BTE) - CARENCES EN BIOTINE ET A JEUN - CARENCES EN BIOTINE A JEUN ET TRAITES AU BTE - CARENCES EN BIOTINE A JEUN ET TRAITES A LA THIO-2-ETHYLAMINE (T2E)

Le tableau V rapporte les résultats obtenus dans une expérience analogue effectuée à partir de rats carencés en biotine. Nous avons déjà souligné dans l'introduction le rôle de la biotine dans le métabolisme des lipides et dans ce premier chapitre de cette première partie, nous indiquons la composition du régime de carence imposé aux rats pendant le mois précédant les expériences. Dans cet essai, on compare en outre l'action du chlorhydrate de BTE avec celle de la thio-2-éthylamine (T2E) administrée dans les mêmes conditions.

Les poids des lipides obtenus dans les différents lots ne sont pas homogènes à cause des variations individuelles importantes en réponse à la carence. Néanmoins, l'état séborrhéique dû à cette hypovitaminose ayant été contrôlé par mesure du taux de sécrétion des lipides externes de 48 heures entre le 14ème et le 16ème jour de la carence (en moyenne 250 mg/kg chez les témoins et 530 mg/kg chez les rats carencés) on peut valablement comparer les séries.

L'incorporation d'acide oléique dans les lipides neutres révèle, d'une part une activité plus faible chez les rats traités avec le BTE qu'il y ait eu jeûne ou non et, d'autre part une activité plus élevée chez les rats à jeun par rapport aux rats nourris. Ces résultats confirment ceux obtenus dans l'expérience précédente sur les rats non carencés.

	RATS CARENCES	RATS CARENCES + BTE	RATS CARENCES A JEUN	RATS CARENCES A JEUN + BTE	RATS CARENCES A JEUN + T2E
• Poids des lipides neutres (mg)	162	247	227	141	102
• Activité totale (dps)	3340	3410	6490	2630	7040
• Activité spécifique (dps/mg)	20,6	13,8	28,6	18,6	69,0

- RESULATS DES MESURES DE L'ACTIVITE DES LIPIDES NEUTRES CUTANES DE RATS CARENCES A JEUN OU NON ET TRAITES OU NON AVEC LE CHLORHYDRATE DE BTE OU LA THIO-2-ETHYLAMINE (T2E) APRES INCUBATION DES PEAUX AVEC DE L'ACIDE OLEIQUE 10-^{14}C -

TABLEAU V

Chez les animaux traités avec la T2E, on observe une trés forte incorporation au niveau des lipides neutres, l'activité étant nettement supérieure à celle obtenue dans le lot à jeun. Ce résultat confirme des observations cliniques et histologiques effectuées chez des rats carencés en biotine et traités par voie d'application cutanée avec la T2E. On obtient, dans ce cas, des rats d'aspect plus gras et des images histologiques de glandes sébacées nettement hypertrophiées (expériences non publiées).

3) INCORPORATION CUTANEE D'OLEATE DE SODIUM 10-^{14}C CHEZ DES RATS SAINS TRAITES OU NON PAR DES DERIVES CYSTEAMINIQUES OU CYSTEINIQUES

Le tableau VI montre les résultats de l'incorporation d'oléate de sodium dans les triglycérides cutanés isolés après traitement in vivo et expérience in vitro dans les 9 séries de rats suivantes :

. 1 - : Rats nourris normalement (N)
. 2 - : Rats à jeun (J)
. 3 - : Rats à jeun traités à la pyridine N-oxyde-S-cystéine (J + N.OCP)
. 4 - : Rats à jeun traités à la S. méthoxycarbonylméthyl L cystéine (J + M.CMC
. 5 - : Rats à jeun traités au chlorhydrate de cystéine (J + CC)
. 6 - : Rats à jeun traités au malate de BTE (J + BTE. M)
. 7 - : Rats à jeun traités au tartrate de BTE (J + BTE. T)
. 8 - : Rats à jeun traités au chlorhydrate de BTE (J + BTE. C)
. 9 - : Rats à jeun traités au carboxyméthylcystéinate de BTE (J + dérivé mixte

Dans ces 9 séries, on retrouve :

. 3 séries de rats traités par des dérivés de la cystéine
. 3 séries de rats traités par des dérivés de la cystéamine
. 1 série de rats traités par un dérivé mixte cystéamine-cystéine
. 2 séries témoins : rats normaux et rats à jeun.

Si l'on considère l'activité spécifique des triglycérides, on remarque que dans cette expérience encore, les rats à jeun non traités synthétisent davantage de triglycérides que les rats nourris normalement : (19 dps/mg chez les rats nourris, 88 dps/mg chez les rats à jeun). Par contre, ici encore, les rats à jeun traités au chlorhydrate de BTE se comportent différemment des rats à jeun non traités et le taux d'incorporation d'oléate dans les triglycérides des rats à jeun traités au chlorhydrate de BTE est voisin de celui des rats normaux (14,5 dps/mg).

	N	J	J+N.OCP	J+M.CMC	J+CC	J+BTE.M	J+BTE.T	J+BTE.C	J + dér.mixte
. Poids (mg)	219	106	53	59	90	74	123	40	119
. Activité totale (dps)	4160	9328	11660	6667	5400	1694	1722	580	3451
. Activité spécifique (dps/mg)	19	88	220	113	60	22	14	14,5	29
	Témoins		(dérivés cystéiniques)			(dérivés cystéaminiques)			

. Légende à la page : 32

- ACTIVITE DES TRIGLYCERIDES CUTANES DE RATS A JEUN OU NON ET TRAITES OU NON PAR DIFFERENTS DERIVES CYSTEINIQUES OU CYSTEAMINIQUES -

TABLEAU VI

On remarque, d'autre part, que les taux d'incorporation de l'oléate dans les fractions triglycérides chez les rats à jeun traités avec des sels différents de la benzyl-thio-2-éthylamine sont très voisins de l'incorporation dans la série témoin : rats nourris. Il y a donc bien avec les sels de la benzyl-thio-2-éthylamine une inhibition de la synthèse des triglycérides.

Par contre, on constate un effet inverse en traitant des rats à jeun avec des dérivés de la cystéine. Il y a dans ce cas, une augmentation variable selon les sels, de l'incorporation de l'oléate dans les triglycérides par rapport aux rats nourris et aux rats à jeun traités par les sels de BTE. Cette incorporation dépasse même parfois celle de l'oléate chez les rats à jeun non traités.

Remarquons, toutefois, que ne figure pas dans ces séries un sel de benzyl cystéine.

Le dérivé mixte a une action qui se rapproche de celle des dérivés cystéaminiques, action que l'on peut expliquer par la présence du groupement benzyl-thio-2-éthylamine au sein de la molécule.

Chapitre III

DISCUSSION

Nos expériences sont du même type que celles effectuées par d'autres auteurs (38) (39) (40) qui, travaillant avec de l'acétate de sodium, du glucose ou du stéarate de sodium comme précurseurs métaboliques, ont abouti à la conclusion qu'après une période de jeûne, il se produit un ralentissement de la liposynthèse dans le tissu adipeux. Or, au niveau de la peau totale, on constate, au contraire, une liposynthèse accélérée in vitro après une période de jeûne.

Cette contradiction n'est en fait qu'apparente puisque ces auteurs étudient la biosynthèse d'acides gras à partir de divers précurseurs puis l'incorporation de ces acides gras nouvellement synthétisés dans l'ensemble des lipides du tissu adipeux et non de la peau.

D'autre part, étant donné que la peau possède deux types de lipides nettement différents - lipides de réserve analogues aux lipides du tissu adipeux et lipides spécifiques épidermiques et sébacés - (41) (42), le jeûne pourrait avoir un effet différent sur les lipides spécifiques ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la lipogénèse constatée au cours de nos expériences chez les rats à jeun non traités par rapport aux rats normaux.

On ne peut exclure, non plus, qu'il se produise au cours du jeûne un phénomène de compensation se traduisant par l'accélération de la liposynthèse dans les lipides épidermiques et sébacés, ceci par analogie avec ce qui se passe lors d'un traitement hypo ou hypercholestérolémiant. En effet, de récents travaux sur l'effet d'agents stimulant la synthèse hépatique du cholestérol ou l'inhibant montrent clairement que ces effets sont contrebalancés par des ajustements en sens opposé des taux de cholestérogénèse au niveau de la peau (43) .

Dans une expérience analogue, ZIBOH et HSIA (44) observent également que l'incorporation d'acétate 1-^{14}C dans les lipides de la peau diminue pendant une période de jeûne pour recroître ensuite in vitro dès que les morceaux de peau sont mis à incuber en présence d'une quantité suffisante de β glycérophosphate.

Enfin, nos observations corroborent sur le plan métabolique les travaux de BULLOUGH et LAURENCE (45) sur les variations des mitoses épidermiques en fonction du jeûne chez la souris. Ces auteurs montrent, en effet, qu'après une période de long jeûne au cours de laquelle le taux des mitoses avait considérablement décru, le fait de placer l'épiderme in vitro en milieu salin provoquait une accélération de la division cellulaire à un taux nettement supérieur à la normale.

Quoiqu'il en soit, il semble que nous ayons affaire dans ce cas précis, à une propriété spécifique cutanée. Ainsi, compte tenu des possibilités d'action du jeûne au niveau cutané, on peut admettre que le chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine agit préférentiellement sur les lipides spécifiques de la peau. En effet, les résultats obtenus montrent que ce sel agit directement sur le métabolisme des lipides cutanés en inhibant la synthèse des lipides neutres, et, en particulier, celle des triglycérides alors que la synthèse de certains phospholipides est au contraire accrue.

Si l'on considère la chaîne métabolique des lipides (figure 9), on voit que la première étape de la lipogénèse consiste en la fixation de deux acides gras sur les alcools primaire et secondaire de l' α glycérophosphate. Les acides gras sont auparavant activés par le Coenzyme A et vont estérifier l' αGP en α et β alors qu'ils sont sous la forme d'acyl CoA. C'est ainsi que l'on obtient la formation d'acide phosphatidique. Après la formation de cet acide, la synthèse peut s'orienter, soit vers la formation des lipides neutres, c'est-à-dire monoglycérides, diglycérides et triglycérides, soit vers la formation des phospholipides. La synthèse des diglycérides s'effectue par une déphosphorylation de l'acide phosphatidique ; cette déphosphorylation est réalisable grâce à l'intervention d'une enzyme : la phosphatidate phosphatase.
Ultérieurement, la fixation d'un troisième Acyl CoA sur l'alcool primaire libre du diglycéride conduit à la formation des triglycérides. L'enzyme impliquée dans cette réaction est la diglycéride acyl transférase.

Par contre, l'acide phosphatidique peut donner naissance aux phospholipides par des voies différentes : les unes qui impliquent sa déphosphorylation préalable (voie de KENNEDY, la plus classiquement rencontrée), les autres qui ne l'impliquent pas. L'intermédiaire formé est alors la cytidine diphosphodiglycéride qui, avec la sérine, conduit à la formation de la phosphatidylsérine, puis, par décarboxylation à la phosphatidyléthanolamine ; enfin, l'intervention de l'adénosylméthionine permet la transformation de la phosphatidyléthanolamine en phosphatidylcholine. Ainsi, en considérant la chaîne métabolique de synthèse des lipides à partir de l' αGP et en se rapportant aux tableaux III et IV, on s'aperçoit que la première réaction qui permet de passer de l' αGP aux acides phosphatidiques n'est pas inhibée par le BTE puisque l'on observe les mêmes taux d'incorporation chez les rats traités et non traités au niveau de ces acides.Par contre, on retrouve peu d'activité dans les triglycérides et une incorporation au contraire accrue dans les phosphatidyléthanolamines - sérines ainsi que dans les phosphatidylcholines des rats à jeun traités par rapport aux rats témoins à jeun.

On peut donc penser que les sels de benzyl-thio-2-éthylamine agissent en inhibant la phosphatidate phosphatase ce qui expliquerait une faible incorporation dans les triglycérides puisque, pour leur formation, la déphosphorylation de l'acide phosphatidique semble obligatoire. Mais, si la diminution d'incorporation au niveau des triglycérides chez les rats à jeun traités a pour cause l'inhibition de la déphosphorylation de l'acide phosphatidique, le fait d'observer parallèlement une synthèse accrue de phosphatidylsérines , phosphatidyléthanolamines et de phosphatidylcholines entraîne que l'anabolisme des phospholipides doit s'effectuer préférentiellement par une autre voie qui ne fait pas intervenir de déphosphorylation. Cette voie pourrait être celle de BREMER et GREENBERG (voie 2' figure 9) au lieu de celle de KENNEDY (voie 2 figure 9) qui est la plus classique mais qui implique la déphosphorylation préalable des acides phosphatidiques.

Les dérivés cystéiniques n'inhibent pas la synthèse des lipides, mais au contraire semblent la favoriser. Si l'on rapproche de leur action, l'action d'un dérivé cystéaminique sans radical benzyle comme la thio-2-éthylamine, étudiée sur les rats carencés en biotine, on remarque que ces composés agissent dans le même sens pour favoriser l'incorporation d'oléate. Devons-nous conclure que le radical benzyle est essentiel pour obtenir l'inhibition de la synthèse des triglycérides ? Il est à ce stade prématuré de conclure.

D'autres hypothèses peuvent être avancées : en effet il est également une troisième voie de synthèse des lécithines d'importance biologique : c'est l'acylation des lysolécithines (voie de LANDS-MERKL). Le cycle lécithines ⟷ lysolécithines est extrêment rapide et permet le transfert d'acides gras. Cette synthèse partielle de phospholipides s'oppose aux autres voies de synthèse complète. D'autre part on sait que certains triglycérides en particulier ceux qui constituent les lipides des membranes cytoplasmiques ont une vitesse de renouvellement rapide. Les acyltransférases et lipases intervenant dans cette réaction ont été isolées à partir de nombreux tissus.

On peut donc imaginer que le BTE puisse intervenir dans ces transferts d'acides gras par exemple en inhibant les diglycérides acyltransférases ce qui aurait pour effet de favoriser comme on l'a vu la synthèse de certains phospholipides ; au contraire, les acyltransférases se rapportant aux phospholipides pourraient être activées et la synthèse de ces phospholipides serait favorisée aux dépens de la synthèse des triglycérides.

On peut également penser que le BTE possédant un groupement β thioéthylamine, protégé par un radical benzyle, peut agir par analogie avec les substances radioprotectrices par inhibition de la peroxydation tissulaire en détruisant certains radicaux libres (46) ou en formant des disulfures mixtes transitoires avec les groupements thiols des enzymes tissulaires (21) (47). En effet, dans la peau on retrouve de nombreuses substances facilement peroxydables et, en particulier, les acides gras insaturés qui accélèrent d'autant plus l'action lipoformatrice au niveau cutané qu'ils sont plus peroxydables. Dans les expériences précédentes, on a observé que la cystéamine (T2E) augmentait considérablement l'incorporation d'acide oléique dans les triglycérides cutanés. Or, SKREDE et CHRISTOPHERSEN (22) ont montré que la cystéamine seule stimule fortement la peroxydation des lipides, mais que, si l'autoxydation du thiol est contrariée, la peroxydation des lipides n'a pas lieu. On peut donc envisager

une hypothèse d'action sur le métabolisme des lipides en se référant à la théorie de PERSHAN (46) puisqu'en effet, le BTE où le SH est protégé par un groupement benzyle, se révèle un bon agent inhibiteur de la lipogénèse alors que la T2E montre un effet inverse.

Par ailleurs, en s'appuyant sur l'hypothèse d'ELDJARN (21) (47), on peut admettre à priori que le BTE au niveau cellulaire s'hydrolyse en donnant un radical S. potentiel qui peut former des disulfures mixtes avec le SH de certaines enzymes ou de certains vecteurs.

. Le comportement des molécules cystéiniques est différent. Elles favorisent, au contraire, l'incorporation d'oléate in vitro après une longue période de jeûne.

Cependant, un certain nombre d'expériences (non publiées) démontrent que ces substances corrigent un excès de sébum. Leur mécanisme d'action serait donc totalement différent et nos constatations n'excluent pas les propriétés qui leur ont été attribuées.

L'action des dérivés cystéiniques comme agent correcteur d'un excès de sébum pourrait s'expliquer par les travaux de ZARUBA et coll. (48) qui signalent que la cystéine et le mercaptoéthanol inhibent de 50 % l'activité de la phosphodiesterase. Il s'ensuit un excès d'AMP cyclique que l'on sait être actif sur les lipases. Ainsi, malgré une production accrue de triglycérides en présence des dérivés cystéiniques il y aurait ultérieurement rééquilibre par action des lipases indirectement activées par l'inhibition de la phosphodiesterase.

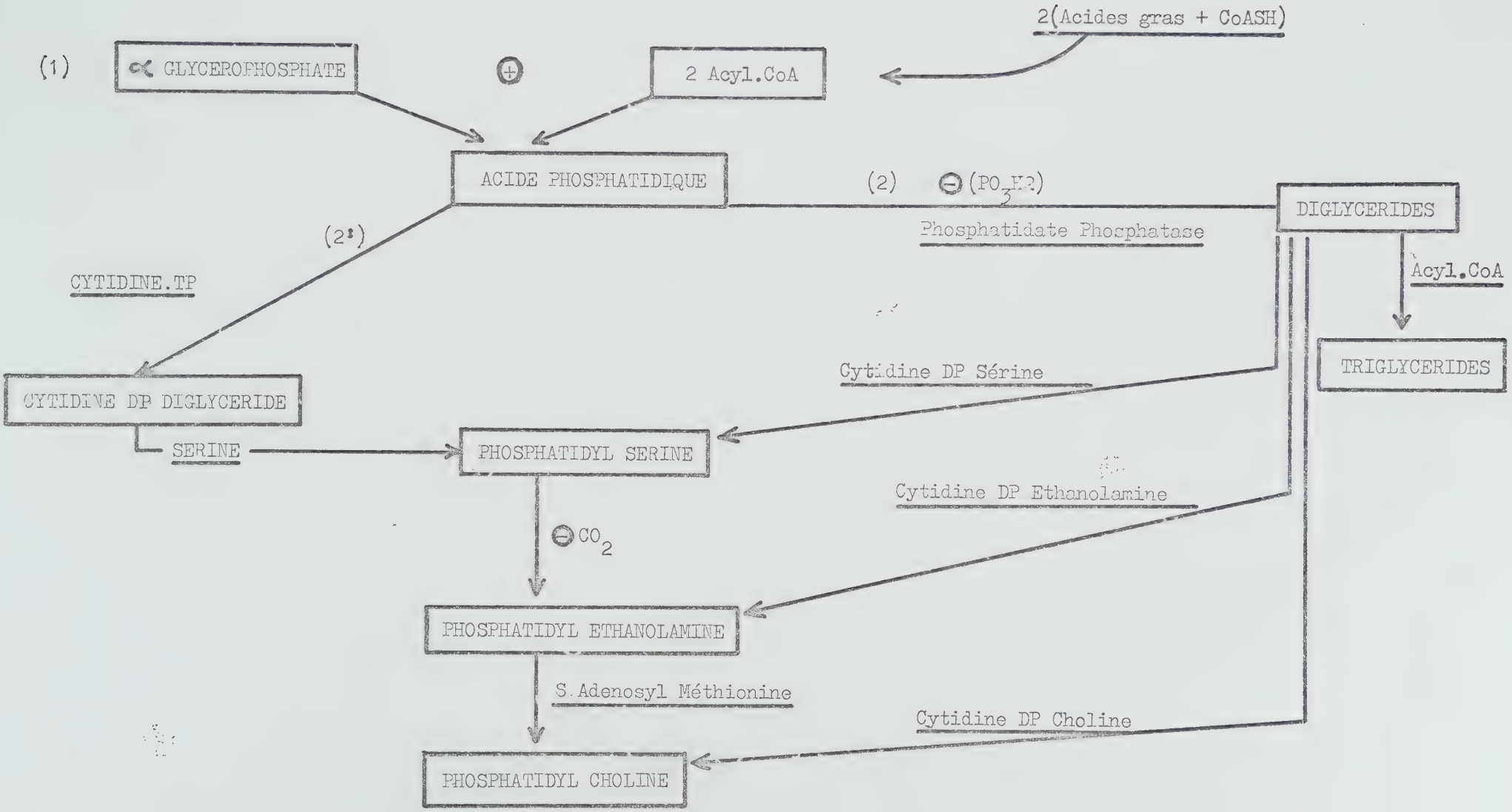
Pour expliquer, par contre, l'inhibition de la synthèse des triglycérides, nous avons formulé plusieurs hypothèses parmi lesquelles :

- inhibition de l'enzyme responsable de la déphosphorylation des acides phosphatidiques : la phosphatidate phosphatase.

- inhibition des glycérides acyltransférases mais par contre activation des acyltransférases se rapportant à certains phospholipides.

Nous avons par la suite vérifié la validité d'une de ces hypothèses en contrôlant l'activité antiphosphatasique éventuelle de ces molécules.

FIGURE 9 - BIOSYNTHESE DES LIPIDES -



- 2ème Partie -

. ACTION DE QUELQUES DERIVES SOUFRES SUR LES PHOSPHATASES ACIDES EPIDERMIQUES DU RAT .

Chapitre I

INTRODUCTION : PROPRIETES DE LA PHOSPHATIDATE PHOSPHATASE

Selon COLEMAN et HÜBSCHER (49) ce sont KENNEDY (50) et PAULUS (51) qui, les premiers, ont mis en évidence le rôle de l'acide phosphatidique comme intermédiaire de la synthèse des Phospholipides et Triglycérides.
HOKIN et HOKIN (52), à la même époque, en 1958, identifient pour la première fois des acides phosphatidiques dans de nombreux tissus d'animaux fraîchement sacrifiés tandis que, deux ans plus tard, HÜBSCHER et CLARK (53) isolent ces acides du foie des mammifères.
SMITH et ses collaborateurs (54) dans le même moment décrivent des préparations subcellulaires de foie de poussin qui déphosphorylent l'acide phosphatidique. Ceci fut confirmé par ROSSITER et STRICKLAND (55) et par HOKIN et HOKIN (56).
L'enzyme qui catalyse la déphosphorylation des acides phosphatidiques a reçu le nom de phosphatidate phosphatase (EC.3.1.3.4).

Il est trés difficile de préciser dans quel organite se localise la phosphatidate phosphatase.
Pour JOHNSTON et BEARDEN (57) l'activité de cette enzyme se retrouve au niveau des mitochondries et des microsomes dans la muqueuse intestinale.
Cependant, POMAZANSKAYA (58) précise que l'activité de la phosphatidate phosphatase mitochondriale décroit au cours de l'embryogénèse alors qu'elle reste constante au niveau des microsomes.
La plupart des auteurs identifient en fait l'enzyme au niveau des microsomes et ceci dans des tissus variés (foie, rein, muqueuse intestinale) (54) (59) (60) (61) (62) (63) (64).
La phosphatidate phosphatase est également présente dans les lysosomes (65) (66) du foie de rat.

Cependant, RONCARI et HOLLENBERG (67) pensent même que si les lysosomes renferment cette enzyme, à ce niveau, elle ne prend pas part à la synthèse des lipides (68).
Enfin, l'addition d'un surnageant 109.000 g à une préparation microsomale stimule la biosynthèse des lipides. Certains auteurs attribuent ce fait à la présence de la phosphatidate phosphatase libre dans un surnageant de haute centrifugation (61) (64) (69) (70).
RONCARI et HOLLENBERG (67) rapportent que cette possibilité est à exclure car ROSE (71) VAUGHAN (72) SEDGWICH et HUBSCHER (68) WILGRAM et KENNEDY (66) JOHNSTON et BEARDEN (57) ont démontré que l'enzyme est presque entièrement liée aux particules subcellulaires et, en particulier, aux microsomes. De plus, le fait que l'effet d'activation par le surnageant a toujours lieu après traitement à la chaleur (67) suggère finalement que ce surnageant active la phosphatase par un activateur non protéique tel que Co^{++} qui reproduit les effets du surnageant.

La phosphatidate phosphatase est peu spécifique : son substrat préférentiel est par définition l'acide phosphatidique mais l'α glycérophosphate, le β glycérophosphate sont également déphosphorylés par la phosphatidate phosphatase(54) (59). Selon POMAZANSKAYA (58) cette phosphatase est de 10 à 14 % moins active sur un substrat β glycérophosphate que sur un substrat acide phosphatidique. L'enzyme a un pH optimum compris entre 5,0 et 6,0 et un Km de 0,2 mM (49) (54) (58) (59) (73). C'est donc une phosphatase acide.

Cette enzyme de structure lipoprotéique (49) est activée par Co^{++} (67) mais, par contre, inhibée par d'autres cations divalents comme Mg^{++} (49) (54) (55). La phosphatidate phosphatase est également inhibée par le p.chloromercuribenzoate (49). Le tween 20 à la concentration de 3 mg par ml inhibe la préparation enzymatique de 50 % (54).
Enfin, BRANDES et SHAPIRO ont montré que le palmitoyl CoA inhibe la phosphatidate phosphatase par un mécanisme d'inhibition compétitif (73). Ces auteurs obtiennent 75 % d'inhibition pour 2.10^{-4}M de palmitoyl CoA après incubation d'une heure à pH 5,7 de 0,66 μMole d'acide phosphatidique et de 770 μg d'enzyme protéine purifiée.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré, par des expériences d'incorporation d'acide oléique 10-^{14}C, qu'en présence de dérivés cystéaminiques, nous avions une inhibition nette de la synthèse des triglycérides et par contre, une augmentation de la synthèse des phosphatidyl-éthanolamines-sérines et cholines.

Puisque la déphosphorylation des acides phosphatidiques est facultative pour la synthèse des phospholipides, mais, par contre, reste obligatoire selon le schéma classique pour permettre la fixation d'un 3ème acyl CoA en position α' pour former les triglycérides, nous avions conclu qu'une inhibition éventuelle de la phosphatidate phosphatase pouvait parfaitement expliquer ce phénomène. Nous avons donc cherché à vérifier cette hypothèse en faisant incuber des préparations enzymatiques de phosphatases avec différents substrats : α ou β glycérophosphate et ceci en présence ou non de différents dérivés soufrés. L'acide phosphatidique n'étant pas soluble dans les milieux aqueux, même sous forme de sel de sodium, il est difficile de l'employer comme substrat pour obtenir des résultats précis et reproductibles. Mais, nous avons souligné plus haut que les phosphatases acides sont trés peu spécifiques (58) (59), seules les vitesses de réaction diffèrent. Aussi, avons-nous utilisé le β glycérophosphate comme substrat pour suivre une éventuelle inhibition des phosphatases acides par les dérivés cystéaminiques et cystéiniques.

Chapitre II

MATERIEL et METHODES

1) SOURCE ENZYMATIQUE

Les phosphatases acides sont extraites selon la méthode de DICKEN et DECKER (74).

1-1 - Milieu d'extraction

. Tampon phosphate 0,01 M pH 7,3

Solution A : NaH_2PO_4 ,1 H_2O 0,138 g % ml H_2O

Solution B : Na_2HPO_4 ,7 H_2O 0,358 g % ml H_2O

. 23 ml de A + 77 ml de B donnent 100 ml de tampon phosphate pH 7,3.

1-2 - Extraction des phosphatases acides

Les phosphatases acides sont extraites à partir de l'épiderme de la peau du dos de rats mâles Wistar de 200 à 230 g. Les rats sont tondus, lavés à l'alcool, puis on prélève, par grattage, à l'aide d'une lame de rasoir, 2 g d'épiderme que l'on recueille dans 100 ml de la solution tampon d'extraction glacée à laquelle on a ajouté 10,26 g de saccharose (0,3 M). Les tissus sont aussitôt homogénéisés dans un tube de POTTER-BRAUN plongeant dans de la glace fondante. La rotation du piston en téflon est de 1.500 RPM. La durée de l'homogénéisation est de 1 minute 30 ce qui correspond à 5 lents aller et retour du piston le long des parois du tube de POTTER. L'homogénat est ensuite filtré sur 3 épaisseurs de gaze. Le filtrat est centrifugé à 900 g à l'aide d'une centrifugeuse JOUAN G 61 pendant 10 minutes.

Le culot qui contient les noyaux et le reste des cellules non broyées n'est pas conservé. Le surnageant est centrifugé 15 minutes à 12.000 g (ultra-centrifugeuse réfrigérée SPINCO-BECKMAN, modèle L 50) dans les tubes du rotor à anfle fixe 30. Le culot obtenu est repris par 25 ml d'une solution de saccharose 0,25 M dans de l'eau distillée et est homogénéisé doucement. On centrifuge 10 minutes à 14.000 g l'homogénat ; le surnageant n'est pas conservé, mais le culot est repris par 25 ml de saccharose 0,25 M dans de l'eau distillée à 0,1 % de TRITON X 100. On homogénéise au tube de POTTER plongeant dans de la glace fondante pendant 3 minutes. Cet homogénat contient les phosphatases acides. L'emploi du Triton est nécessaire afin de libérer les phosphatases des organites (lysosomes) qui les renferment (74) (75) (76) (77). Sur une aliquote de cette solution enzymatique, on dose les protéines selon la technique de LOWRY décrite en fin de chapitre.

2) TECHNIQUE d'INCUBATION

La technique de dosage des phosphatases acides est une adaptation de la méthode décrite par GIANETTO et DE DUVE (78).

2-1 - Préparation des solutions

. Solution tampon MICHAELIS (Acétate de Na ..... 9,714 g
(Diéthylmalonylurée sodé 14,714 g
(Eau distillée q.s.p. 500, ml

. Solution tampon-substrat : α ou β glycérophosphate de Na = 34 mg/ml de tampon MICHAELIS

. HCl 0,1 N.

. NaCl 8,5 % dans de l'eau distillée.

. Acide trichloracétique à 20% dans de l'eau distillée.

2-2 - Préparation des milieux d'incubation

Dans des béchers de 50 ml, on mélange 5 ml de la solution tampon-substrat (α ou β GP) et 2 ml de la solution de chlorure de sodium. Certains béchers contiennent ou non des molécules soufrées à différentes concentrations. On ajuste le pH à 5,4 avec HCl 0,1 N. Cette opération est suivie au pH mètre digital BECKMAN. L'électrode employée est une électrode mixte.

Le choix du pH 5,4 est justifié par les résultats d'une expérience que l'on trouvera détaillée dans le chapitre "Résultats Expérimentaux". On ajuste, ensuite, chaque bécher à 25 ml avec de l'eau distillée.

2-3- Conditions d'incubation

Après agitation, on pipette 9 ml des diverses solutions précédentes. Dans ce volume, la concentration finale en substrat est de 2.10^{-4}M ; les concentrations en molécules soufrées varient de 0 à 5.10^{-4}M . Dans les tubes à incubation contenant les 9 ml de tampon-substrat-molécules soufrées ou non, on ajoute 1 ml de la solution enzymatique précédemment extraite, sauf à 2 tubes témoins (chaque essai étant réalisé en double) qui contiennent la plus grande concentration en molécules soufrées. Ces 2 témoins permettent de déceler une interférence éventuelle des produits à tester avec les réactifs utilisés dans les différents dosages effectués à partir des milieux d'incubation.

Les tubes bouchés sont mis à incuber à 37° C dans une cuve thermostatée. Le temps d'incubation est variable selon le substrat employé. Il a été défini pour chaque substrat (voir chapitre "Résultats Expérimentaux"). L'incubation est arrêtée par addition de 2 ml d'acide trichloracétique à 20 %. Les protéines précipitées sont alors éliminées par ultracentrifugation (70.000 g - 15 minutes au rotor 30 à angle fixe SPINCO-BECKMAN). On prélève 0,2 ml de surnageant pour le dosage de l'acide orthophosphorique libéré pendant l'incubation à partir de l'α ou du β glycérophosphate.

3) DOSAGE DES PROTEINES ET DU PHOSPHORE

3-1- Dosage des protéines de la solution enzymatique selon la méthode de LOWRY (79)

Le réactif de FOLIN (acide phosphotungstique et phosphomolybdique) donne une coloration bleue avec les acides aminés phénoliques. Le dosage a été rendu plus sensible en réalisant d'abord un prétraitement cuproalcalin de la protéine à doser.

3-1-1 Réactifs

. Réactif de FOLIN et CIOCALTEU (TOUZART-MATIGNON)

. Réactif A : carbonate de sodium anhydre ..... 2 g
tartrate double de Na et K ..... 0,02 g
NaOH N/10 q.s.p. 100 ml

. Réactif B : $CuSO_4$, 5 H_2O ..... 0,5 g
H_2SO_4 (concentré) ..... 1 goutte

. Réactif C : on mélange extemporanément 50 ml de A et 1 ml de B.

3-1-2 Dosage

On prépare une gamme étalon avec du sérum lyophylisé BIOTROL classique de manière à avoir une solution à 144 µg de protéines par ml. Les prises d'essai varient de 0 à 1 ml, dans les cas où elles sont inférieures à 1 ml , on complète à ce volume avec de l'eau distillée. Après addition de 3 ml du réactif C, on laisse reposer 10 minutes. On ajoute, enfin, 0,3 ml du réactif de FOLIN en agitant immédiatement. Après 30 minutes à l'obscurité, on détermine les densités optiques des solutions à 750 nm sur un spectrophotomètre BECKMAN DU 2. On trace alors la courbe µg de protéines = F (D.O) (Figure 1). On se rapporte à cette courbe pour évaluer la quantité de protéines contenue dans les solutions à tester.

3-2 Dosage du phosphore selon la technique de FISKE-SUBBAROW (80)

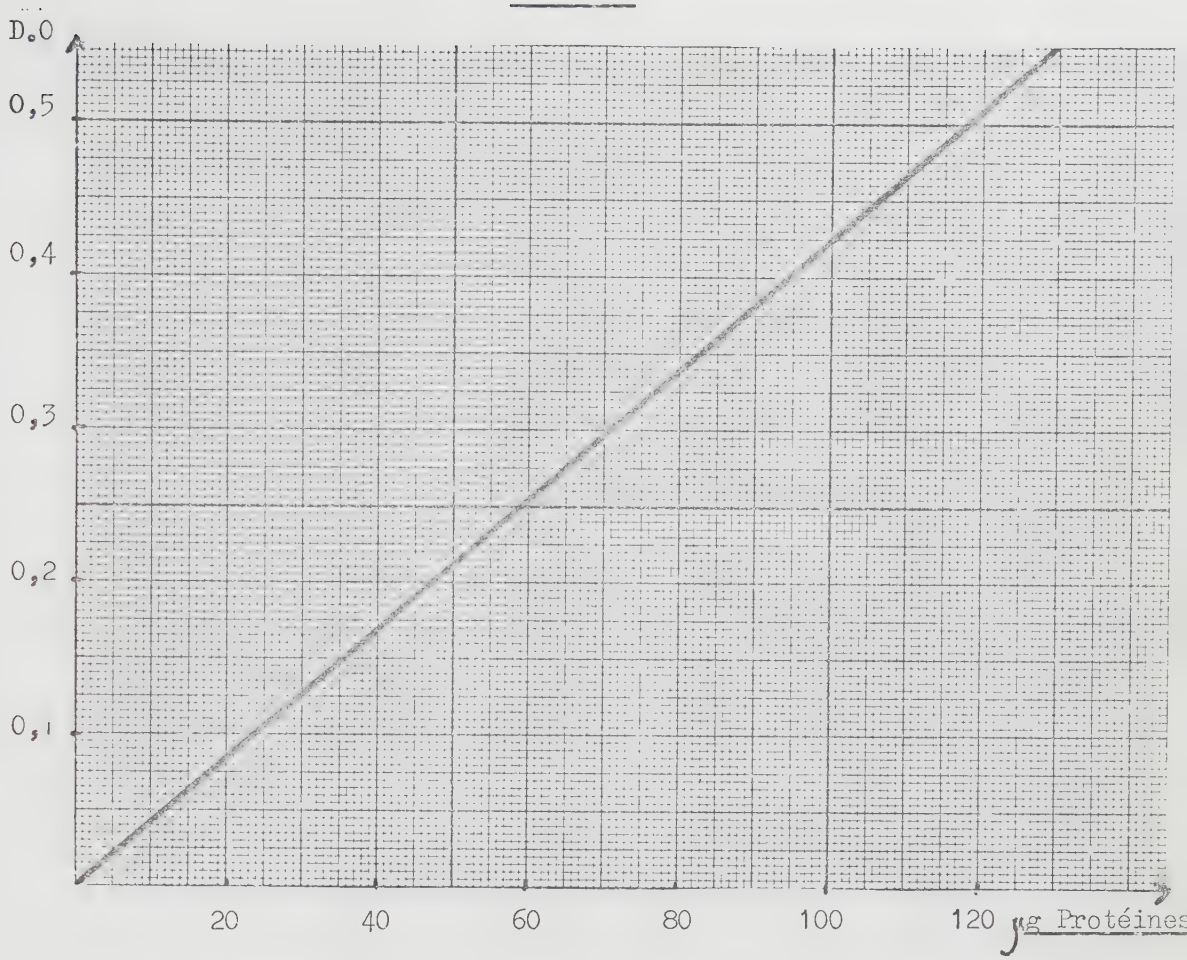
3-2-1 Réactifs

. Solution de molybdate d'ammonium :
On dissout 5 g de molybdate d'ammonium dans 60 ml d'eau distillée chaude. Après refroidissement, on ajoute 15 ml d'acide sulfurique concentré. Le volume est finalement complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

. Réactif réducteur : Acide amino 2 naphtol 4 sulfonique.. 0,2 g
Métabisulfite de sodium ..... 12 g
Sulfite anhydre de Na ..... 1,2 g
Eau distillée q.s.p. 100 ml

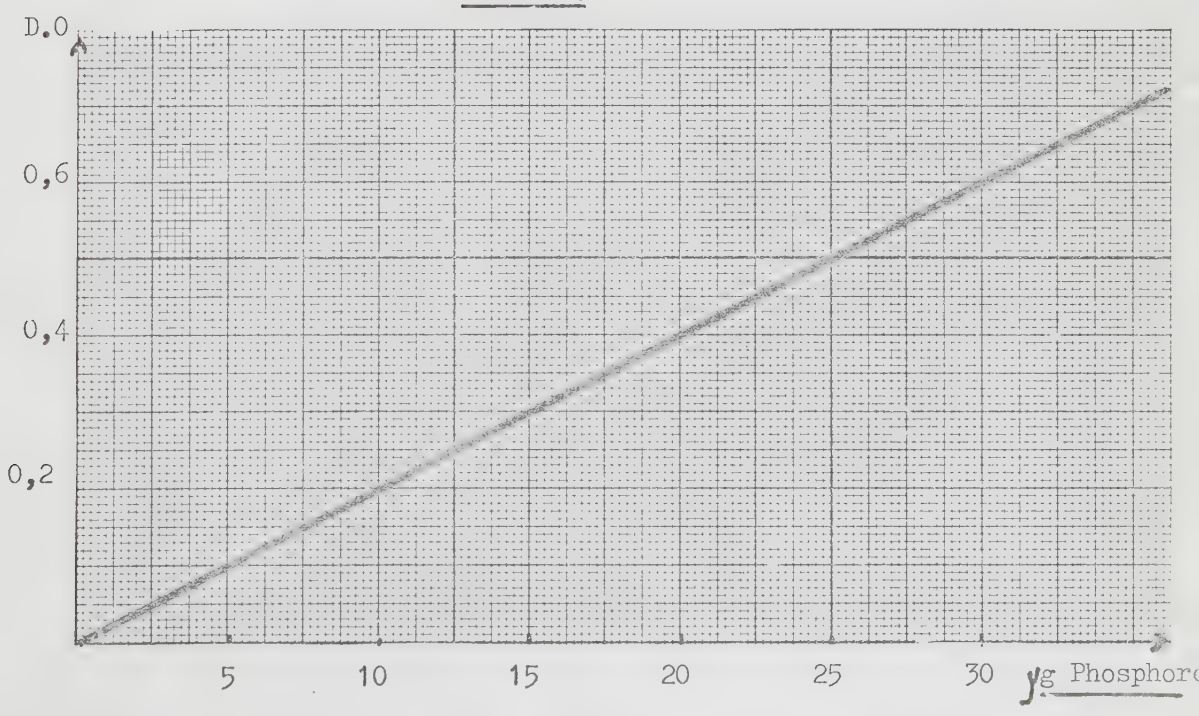
Cette dernière solution à conserver au froid est à renouveler toutes les 3 semaines.

FIGURE 1



GAMME ETALON : DOSAGE DES PROTEINES

FIGURE 2



GAMME ETALON : DOSAGE PHOSPHORE

3-2-2 Dosage

On prépare une gamme étalon avec une solution de phosphate monopotassique (218 mg par litre d'eau distillée), ce qui correspond à une solution de 50 µg de phosphore par ml.
Les prises d'essai varient de 0 à 1 ml.
Dans les cas où elles sont inférieures au ml, on complète à ce volume avec de l'eau distillée.
Puis, on ajoute successivement à chacun des essais :

- 1 ml du réactif au molybdate d'ammonium
- 0,5 ml de la solution réductrice
- 6 ml d'eau distillée.

Après 30 minutes à l'obscurité, on détermine les densités optiques à la longueur d'onde de 770 nm.
On trace alors la courbe µg de phosphore = f (D.O) (Figure 2).

Dans toutes les expériences, on se rapporte à cette courbe pour déterminer la quantité d'acide orthophosphorique, libérée sous l'effet des phosphatases à partir des différents substrats utilisés.

Chapitre III

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1) VITESSE DE LA REACTION ENZYMATIQUE AVEC UN SUBSTRAT β GLYCEROPHOSPHATE

Dans cette première expérience, on suit la libération d'acide orthophosphorique à partir d'un substrat β glycérophosphate en fonction du temps sur une période de 24 heures à pH 5,2 et pour une quantité de protéines de 650 γg/ml.

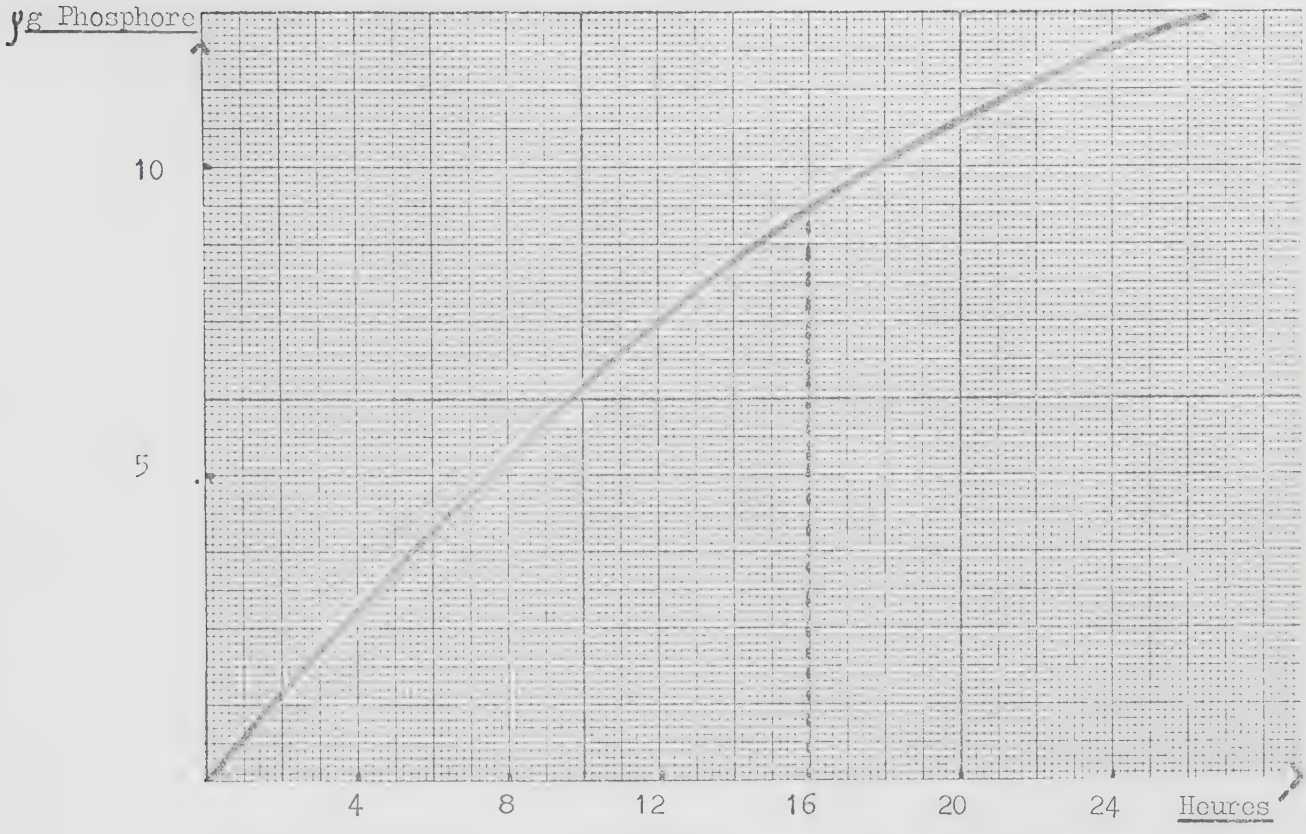
La vitesse maximum n'est pas encore atteinte au bout de 24 heures. Pour des raisons de commodité, nous avons choisi dans les expériences qui suivent un temps d'incubation de 16 heures où la réaction se déroule en vitesse initiale (Figure 3).

2) ACTIVITES DES PHOSPHATASES ACIDES EN FONCTION DU pH

Sur un temps d'incubation d'une durée de 16 heures, on recherche dans cette expérience le pH optimum d'activité des phosphatases acides épidermiques. La courbe γg de phosphate libéré = f (pH) a son maximum pour un pH de 5,4 à 5,5 (Figure 4).

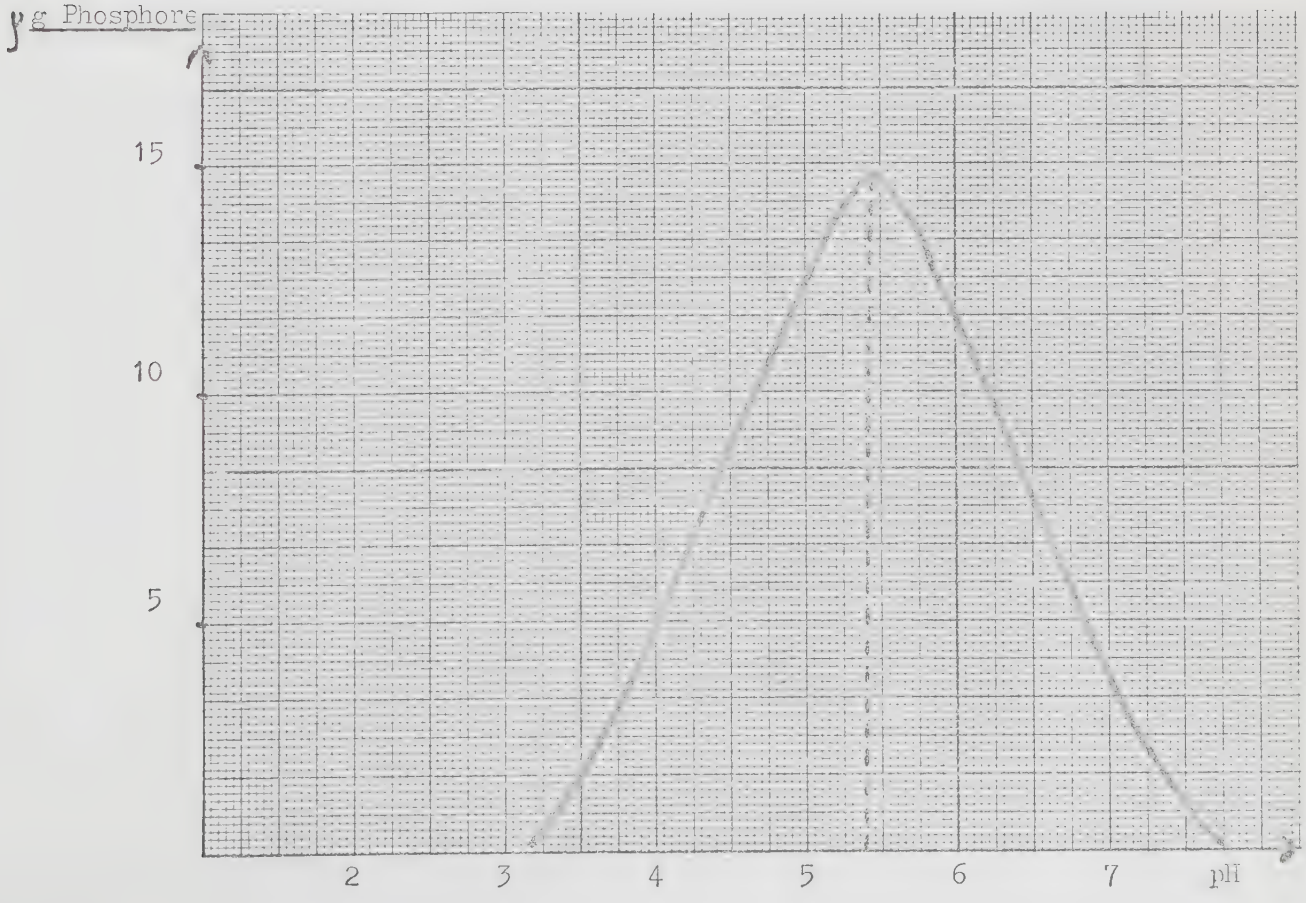
Ainsi, les conditions expérimentales se trouvent définies avec un substrat β glycérophosphate 2.10^{-4} M : pH du milieu d'incubation 5,4 unités $\pm$ 0,1 ; température du bain-marie 37° C ; temps d'incubation 16 heures pour 650 $\pm$ 25 γg de protéines.

FIGURE 3



PHOSPHORE LIBERE A PARTIR DU βGP EN FONCTION DU TEMPS

FIGURE 4



ACTIVITE DES PHOSPHATASES ACIDES EPIDERMIQUES EN FONCTION DU pH

3) INHIBITION DES PHOSPHATASES ACIDES PAR LE MALATE DE BENZYL THIO 2 ETHYLAMINE

Dans cette expérience, on introduit dans certains tubes à incubation du malate de benzyl thio-2-éthylamine et on suit la libération d'acide orthophosphorique en présence ou non du dérivé soufré employé à différentes concentrations.
Les résultats expérimentaux obtenus sont consignés sur le tableau I .

L'examen de ces résultats permet de dire qu'il y a effectivement inhibition des phosphatases acides par le dérivé soufré employé. L'inhibition de la libération d'acide orthophosphorique à partir du β glycérophosphate par le malate de benzyl thio-2-éthylamine est proportionnelle à la concentration en dérivé soufré dans le milieu d'incubation.

La figure 5 qui exprime 1/V en fonction de la concentration en malate de BTE permet de déterminer la constante d'inhibition : le Ki . La valeur de ce Ki déterminée graphiquement est de $2{,}2.10^{-4}$M . Ce résultat s'avère intéressant car il signifie que substrat et inhibiteur ont réagi mole à mole vis-à-vis de l'enzyme.

4) ETUDE CINETIQUE DE L'ACTIVITE DES PHOSPHATASES ACIDES EN PRESENCE OU NON DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'INHIBITEUR (MALATE DE BTE) POUR DES CONCENTRATIONS VARIABLES DU SUBSTRAT (β GLYCEROPHOSPHATE) ET UNE QUANTITE FIXE DE LA PROTEINE ENZYME.

4-1 - Dans cette expérience, il s'agit de préciser à quel type d'inhibition nous avons affaire par une étude de cinétique enzymatique michaelienne. Le phosphore, libéré par les phosphatases acides à partir du substrat β glycérophosphate, est déterminé pour des concentrations variables en inhibiteur, la quantité de protéines enzymes étant constante : 640 γg de protéines par millilitre.

Le tableau II résume l'ensemble des résultats expérimentaux enregistrés : on y trouve pour une quantité d'inhibiteur variant de 0 à 4.10^{-4}M et une concentration en substrat variant de 1.10^{-4}mole à 1.10^{-3}mole : le nombre de γg de phosphore libéré au cours de la réaction ainsi que l'inverse de cette quantité.

	β GLYCEROPHOSPHATE	ENZYMES	MALATE BTE	D.O. à 770 nm.	µg de PHOSPHORE	1/µg de PHOSPHORE
1	2.10^{-4}M	+	0	0,455	23,7	0,0422
2	2.10^{-4}M	+	1.10^{-4}M	0,302	15,7	0,636
3	2.10^{-4}M	+	2.10^{-4}M	0,232	12	0,0833
4	2.10^{-4}M	+	3.10^{-4}M	0,185	9,6	0,104
5	2.10^{-4}M	+	4.10^{-4}M	0,156	8	0,125
6	2.10^{-4}M	0	4.10^{-4}M	0	0	
7	2.10^{-4}M	0	0	0	0	

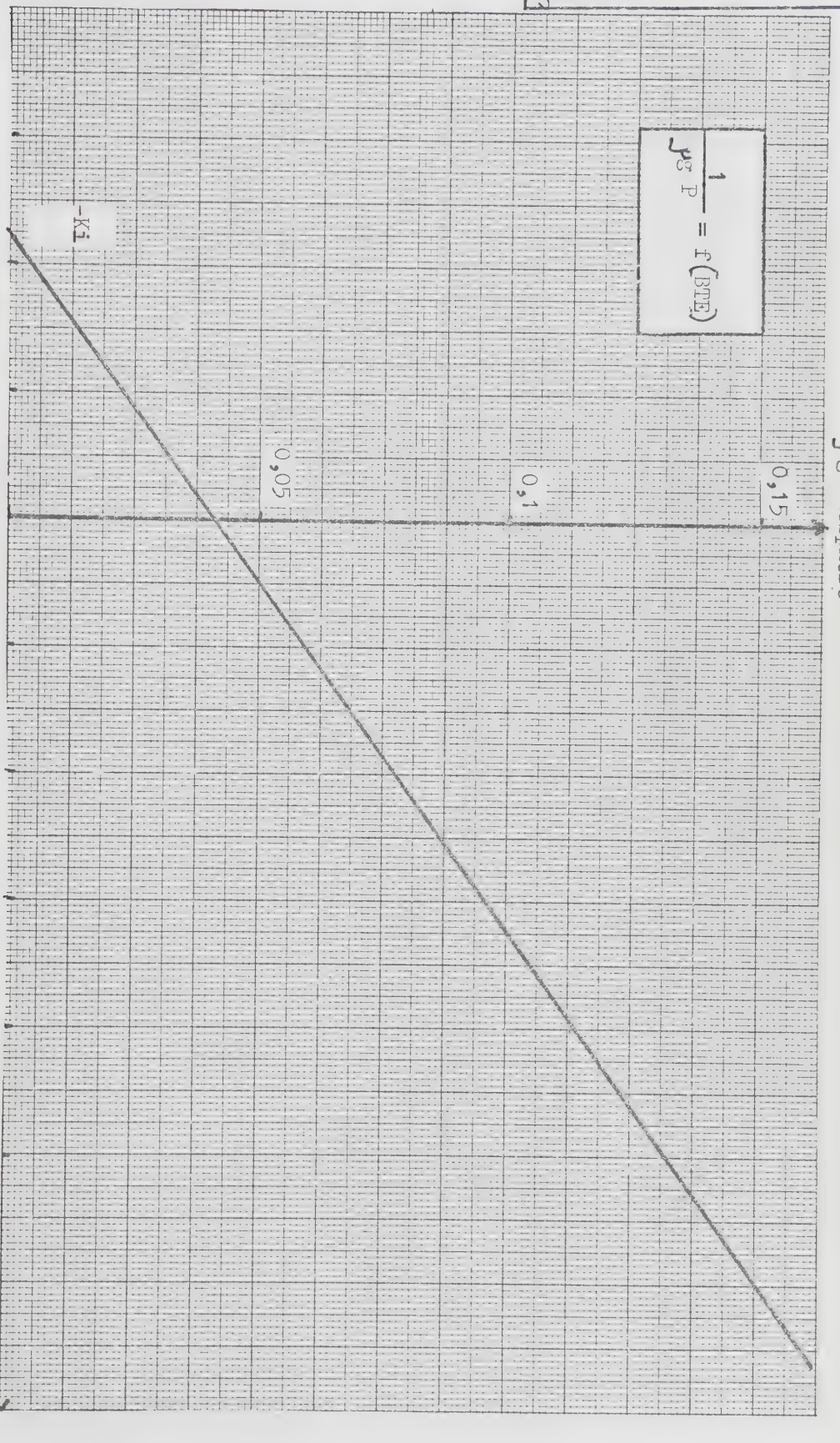
Note : On remarque que la molécule soufrée n'interfère pas dans le dosage du phosphore (tube 6)

- MICROGRAMMES DE PHOSPHORE LIBERE APRES INCUBATION A pH 5,4 de 2.10^{-4}M de β GLYCEROPHOSPHATE ET DE 630 µg DE PROTEINES CONTENANT DES PHOSPHATASES ET EN PRESENCE OU NON DE MALATE DE BTE -

TABLEAU I

FIGURE 5

CINETIQUE DES PHOSPHATASES ACIDES : $\frac{1}{\mu g \text{ de Phosphore}} = f(BTE)$



MALATE BTE (M)		0		1.10^{-4}		2.10^{-4}		3.10^{-4}		4.10^{-4}	
1/MALATE BTE (M)		0		10^{4}		5.10^{3}		$3,33.10^{3}$		$2,5.10^{3}$	
βGP (M)	1/βGP(M)	P	1/P	P	1/P	P	1/P	P	1/P	P	1/P
1.10^{-4}	1.10^{4}	15,6	0,0640	11,8	0,0847	8,7	0,115	6,5	0,154	5	0,200
2.10^{-4}	5.10^{3}	23,7	0,0422	15,7	0,0636	12	0,0833	9,6	0,104	8	0,125
4.10^{-4}	$2,5.10^{3}$	32,4	0,0308	21,6	0,0463	16,2	0,0617	13	0,077	11,3	0,0885
6.10^{-4}	$1,66.10^{3}$	36,2	0,0276	25	0,0400	19,6	0,0510	16,1	0,062	13,2	0,076
1.10^{-3}	1.10^{3}	40	0,0250	28,7	0,0348	22	0,0455	18,8	0,053	16,2	0,061

βGP = β GLYCEROPHOSPHATE P = PHOSPHORE

- CINETIQUE ENZYMATIQUE DES PHOSPHATASES ACIDES POUR DES QUANTITES VARIABLES de SUBSTRAT ET D'INHIBITEUR (MALATE DE BTE) ET UNE QUANTITE FIXE DE PROTEINE-ENZYME -

TABLEAU II

Les valeurs exprimées dans ce tableau servent à construire les courbes expérimentales suivantes :

- Figure 6 : γg de phosphore = f (β glycérophosphate) pour $\neq$ (I)
- Figure 7 : 1/ γg de phosphore = f (1/S) pour $\neq$ (I)
- Figure 8 : 1/ γg de phosphore = f (1/S) pour I = 0
- Figure 9 : 1/ γg de phosphore = f (I) pour $\neq$ (S)
- Figure 10 : points d'intersection de 1/V = f (1/(S)) avec l'ordonnée en fonction de la concentration en inhibiteur.

4-2 - Interprétation des résultats graphiques

4-2-1 - γg de Phosphore = f (β glycérophosphate) pour $\neq$ (I) (Figure 6)

A la concentration la plus forte en substrat (1.10^{-3}mole), on ne se trouve pas encore en vitesse maximum ; il n'y a donc pas de saturation de l'enzyme à la plus forte concentration en substrat. Le malate de benzyl thio-2-éthylamine diminue le V max. de la réaction et il semble peu probable déjà, en considérant cette seule courbe, que le mécanisme d'inhibition soit de type compétitif.

4-2-2 - $\frac{1}{\text{Phosphore}} = f\left(\frac{1}{(S)}\right)$ pour $\neq$ (I) (Figure 7)

Cette courbe apporte une confirmation du type d'inhibition : il s'agit du cas général d'inhibition non compétitive absolue. En effet, la pente, donc la vitesse de libération du phosphore pour des concentrations variables en substrat, est affectée par les concentrations variables de l'inhibiteur employé. De même, l'intersection avec l'axe des ordonnées est modifiée selon la concentration en malate de BTE.

Pour chaque concentration en inhibiteur, la variation de 1/P en fonction de 1/(S) donne une droite. Les droites coupent l'axe des abscisses au même point, quelle que soit la valeur de la concentration en inhibiteur. Ce résultat prouve bien que l'inhibiteur a modifié l'activité (V max) sans modifier la constante de dissociation apparente : le Km .

Cette courbe donne les valeurs d'intersection des droites avec l'axe 1/P pour tracer la courbe représentée à la figure 10.

FIGURE 6

CINETIQUE SIMPLE DES PHOSPHATASES ACIDES INHIBEES PAR LE MALATE DE BTE

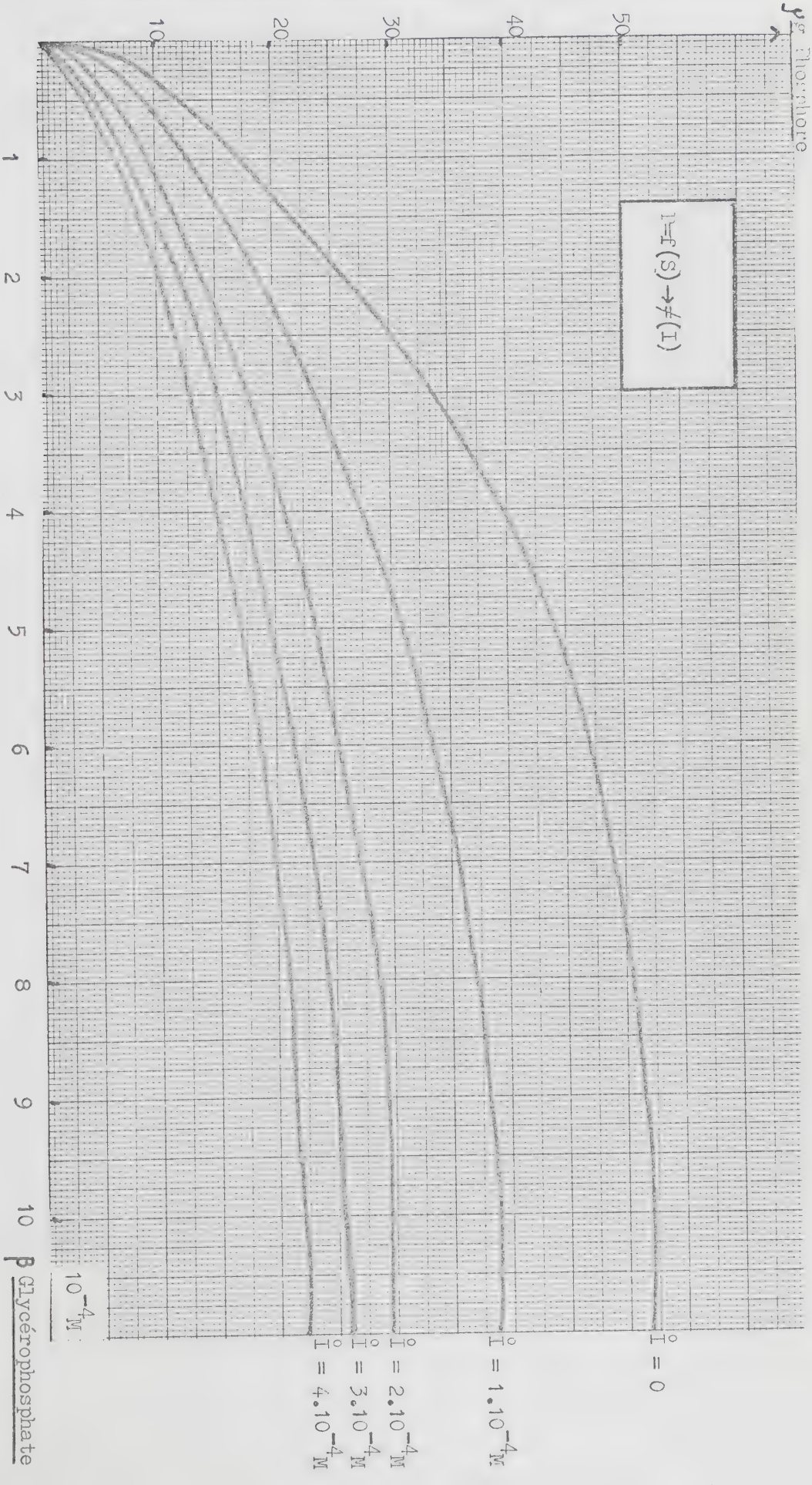
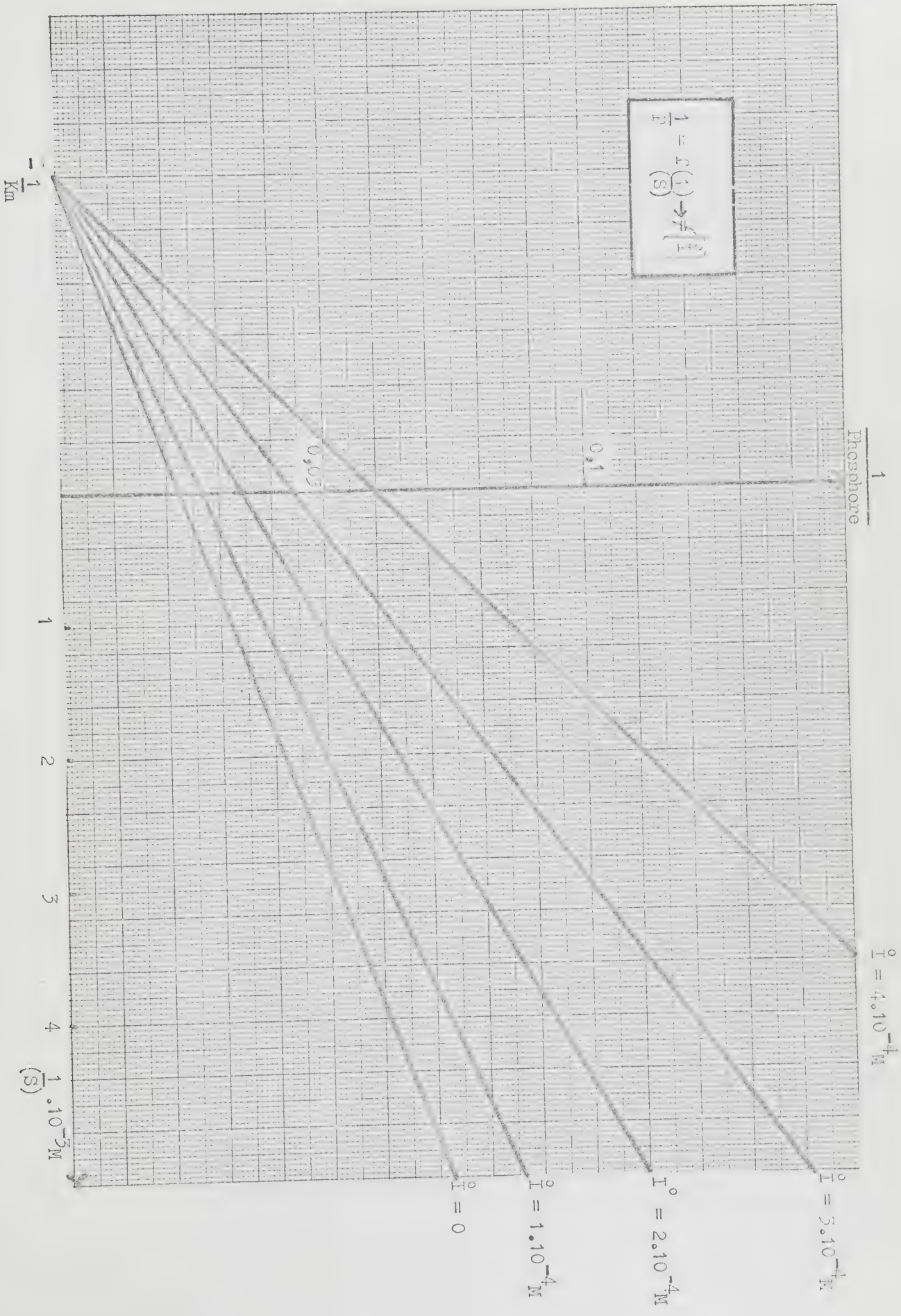


FIGURE 7

CINETIQUE DES PHOSPHATASES ACIDES



4-2-3 $\frac{1}{\text{Phosphore}} = f\left(\frac{1}{(S)}\right)$ pour I = 0 (Figure 8)

La courbe 1/P = f (1/(S)) pour une concentration nulle en inhibiteur permet de déterminer les valeurs de Km et Vm. Dans le tableau II, la quantité de phosphore libéré après incubation, correspond à celle d'une prise d'essai de 0,2 ml.

Le volume final dans chacun des tubes d'incubation étant de 12 ml, le facteur de dilution "d" est donc de 60.

$\frac{1}{Km} = 4{,}7.10^{-3}$ moles $\qquad Km = 2{,}12.10^{-4}$ moles

$\frac{1}{Vm} = 0{,}02 \qquad Vm = 50 \times d \qquad Vm = \frac{50 \times 60}{16} = 187$ µg de phosphore/ml/heure

4-2-4 $\frac{1}{\text{Phosphore}} = f\ (I)$ pour $\neq$ (S) (Figure 9)

Pour chaque concentration en substrat, la variation de $\frac{1}{P}$ en fonction de l'inhibiteur donne une droite. Les droites se rencontrent sur la ligne des abscisses et permettent de préciser la constante d'inhibition : $Ki = 2{,}2.10^{-4}$ moles.
Le fait que Ki soit lu directement sur l'axe des abscisses et non au-dessus de cet axe confirme que l'inhibition est de type non compétitif absolu.

4-2-5 Points d'intersection avec l'ordonnée de $\frac{1}{P} = f\left(\frac{1}{(S)}\right)$ en fonction de la concentration en inhibiteur (Figure 10)

Cette courbe permet de déterminer avec plus de précision Ki et Vm.

$Ki = 2{,}4.10^{-4}$ moles

$\frac{1}{Vm} = 0{,}02 \qquad Vm = 50.d \qquad Vm = \frac{50 \times 60}{60} = 187$ µg de phosphore/ml/heure.

FIGURE 8

DETERMINATION DE Vm et Km A PARTIR DE $\frac{1}{P} = f\left(\frac{1}{(S)}\right)$ pour $\overset{\circ}{I} = 0$

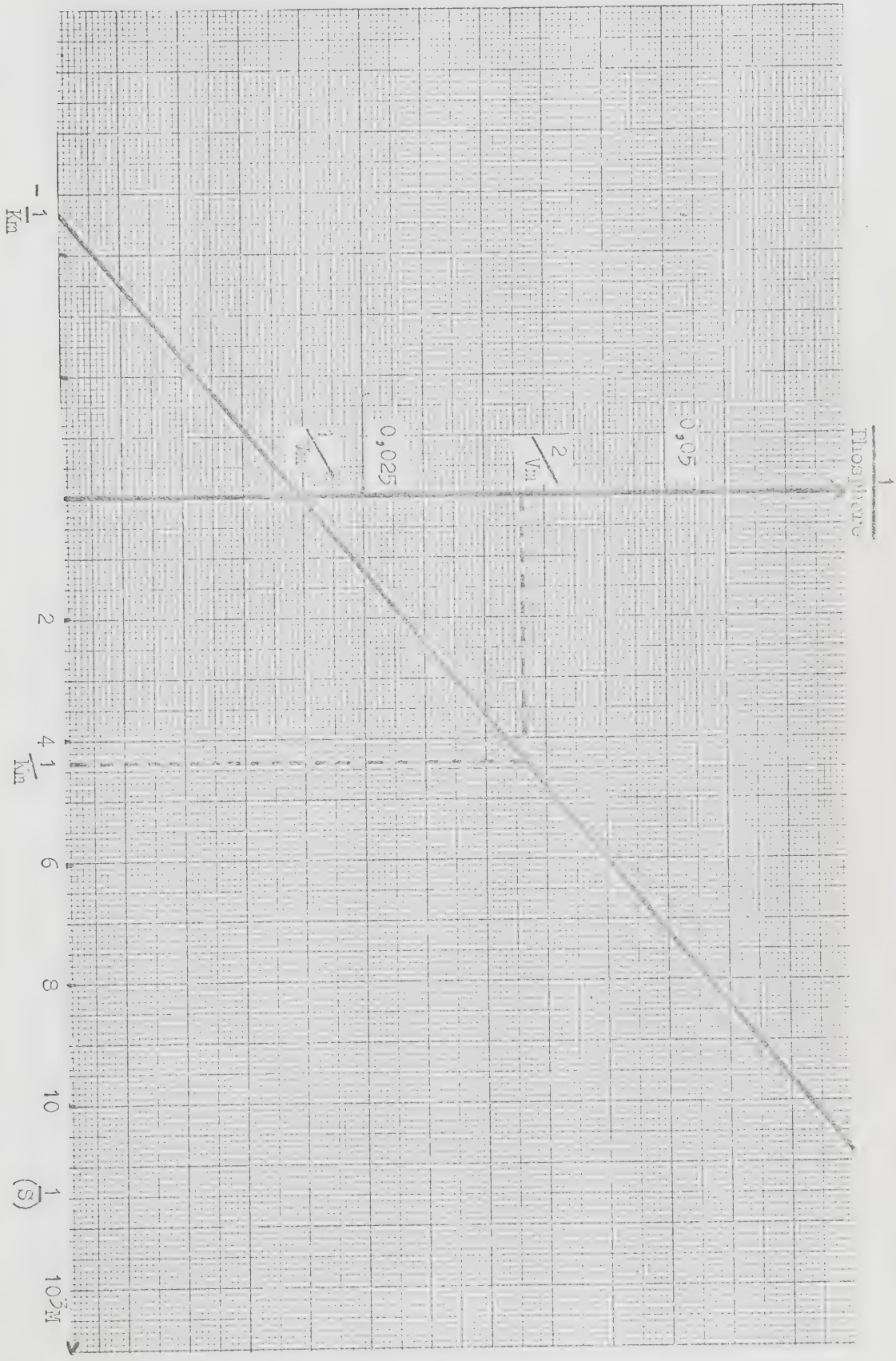


FIGURE 9

DETERMINATION DU Ki DU MALATE DE PTE A PARTIR DE $\frac{1}{P} = f\left(\overset{\circ}{I}\right)$ pour $\neq (S)$

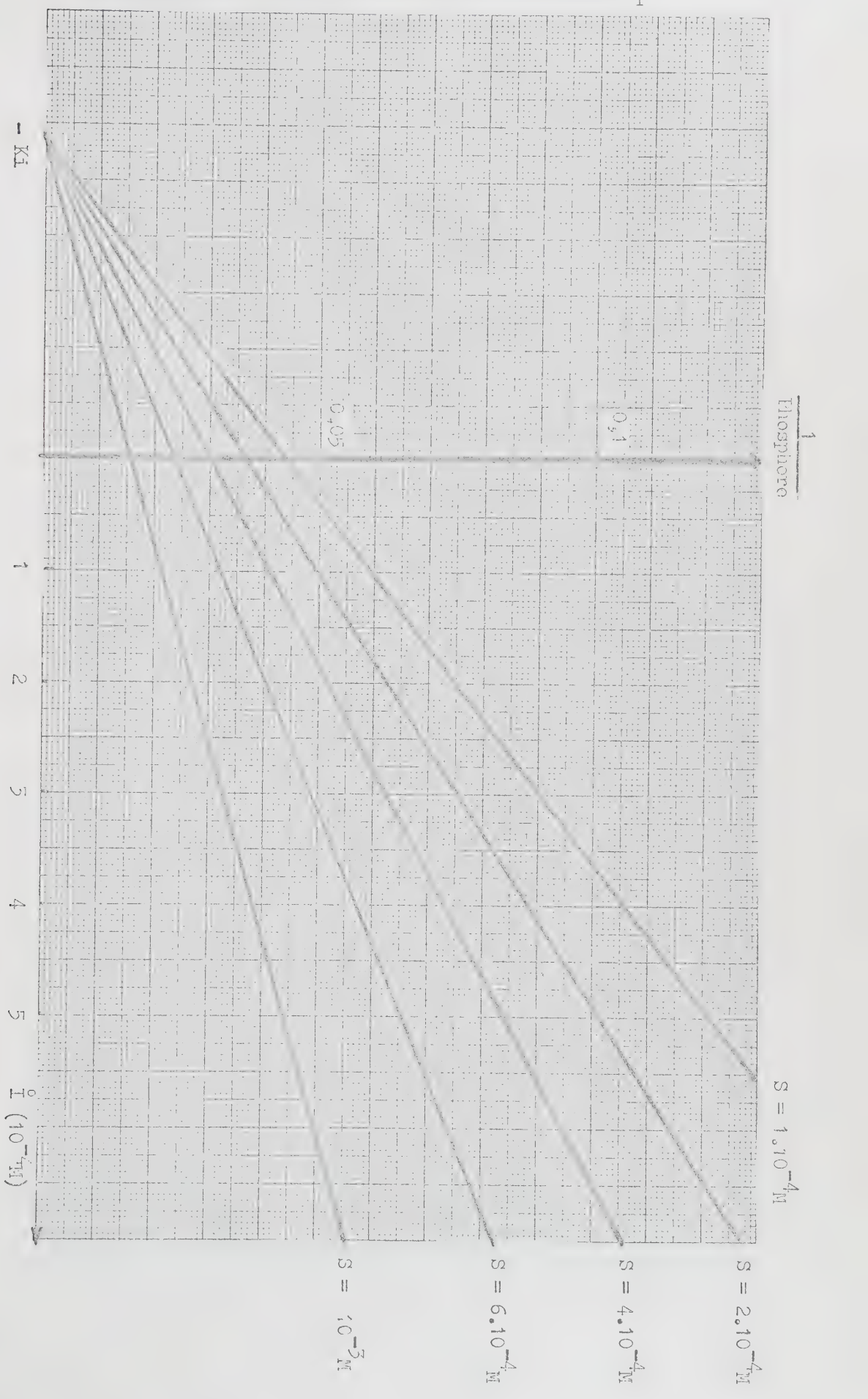
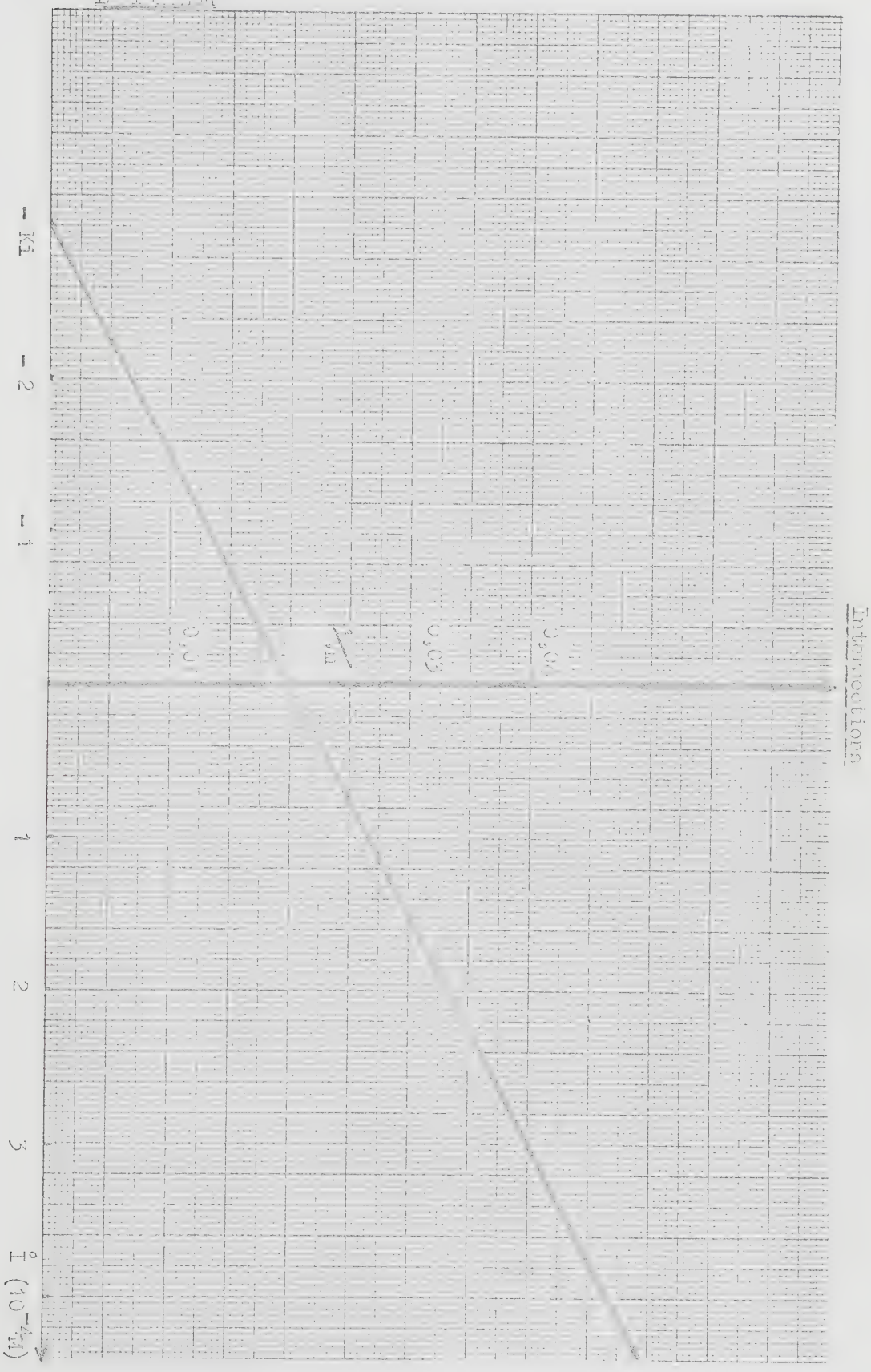


FIGURE 10

DETERMINATION DU Ki EN PORTANT LES POINTS D'INTERSECTION de $\frac{1}{P} = f\left(\frac{1}{(S)}\right)$

AVEC L'ORDONNEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN



4-3 Conclusion

L'inhibition réalisée par le malate de benzyl-thio-2-éthylamine sur la réaction d'hydrolyse du β glycérophosphate catalysée par les phosphatases acides de l'épiderme de rat est de type non compétitif absolu. Il n'existe aucune action directe de la molécule soufrée sur le substrat, mais une fixation sur l'enzyme indépendamment de la formation du complexe β glycérophosphate - phosphatases acides.

Sur les phosphatases acides, il existe donc 2 sites de fixation distincts : un pour le substrat, l'autre pour l'inhibiteur et il y a dans ces conditions formation d'un complexe ternaire - substrat - enzyme - inhibiteur inactif .

De cette expérience, on peut retirer les valeurs de Ki, Km et Vm :

- Vm = 187 γ g de phosphore/ml/heure
  292 γ g de phosphore/mg de protéines et par heure.
- Km = $2,12.10^{-4}$ moles
- Ki = $2,2 .10^{-4}$ moles

Les valeurs de Ki et Km étant voisines, on peut conclure que substrat et inhibiteur ont la même affinité pour l'enzyme.

5) ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTION DE QUELQUES DERIVES SOUFRES SUR L'ACTIVITE DES PHOSPHATASES ACIDES : RELATIONS STRUCTURE - ACTIVITE

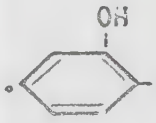
Nous avons, par la suite, déterminé les Ki de quelques dérivés soufrés afin de préciser l'importance des différentes fonctions présentes au sein des molécules. Cette étude va permettre d'établir quelques relations entre la structure et l'activité des molécules étudiées (36).

5-1 Comparaison des Ki des différents sels de benzyl-thio-2-éthylamine (Tableaux III et IV)

Les valeurs des Ki restent toutes du même ordre quel que soit le sel employé, à l'exception du tartrate dont l'activité anti-phosphatasique propre est bien connue (81) (82).

Référence bibliographique (36)

TABLEAU III

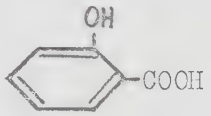
		Ki
• CHOH–COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$ CHOH–COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Tartrate de BTE	$0,15.10^{-4}$M
• HOOC–CHOH–CH_2–COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Malate de BTE	$2,2\ .10^{-4}$M
• C_6H_5–CH_2–COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Phényl acétate de BTE	$2,2\ .10^{-4}$M
• CH_2–COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$ CH_2–COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Succinate de BTE	$2,75.10^{-4}$M
• HCl, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Chlorhydrate de BTE	$2,9\ .10^{-4}$M
• CH_3–CHOH–COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Lactate de BTE	$2,9\ .10^{-4}$M
• $C_6H_5-CH_2-S-(CH_2)_2-NH_2$, HOOC–C–H H–C–COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Fumarate de BTE	$3,15.10^{-4}$M
•  COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Salicylate de BTE	$3,2\ .10^{-4}$M
HO– COOH, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	p. Hydroxybenzoate de BTE	$3,3\ .10^{-4}$M

• $HO-CH_2-\underset{\underset{CH_3}{|}}{\overset{\overset{CH_3}{|}}{C}}-CHOH-CO-NH-(CH_2)_2-COOH$, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Pantothénate de BTE	$3,4.10^{-4}M$
• $C_6H_5-CHOH-COOH$, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Mandélate de BTE	$3,5.10^{-4}M$
• $HO-CH_2-COOH$, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Glycolate de BTE	$3,5.10^{-4}M$
• $H-C-COOH$, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$ $H-C-COOH$, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	Maléate de BTE	$4,3.10^{-4}M$
• $HOOC-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-CH_2-COOH$, $H_2N-(CH_2)_2-S-CH_2-C_6H_5$	L Aspartate de BTE	$4,4.10^{-4}M$

- INHIBITION DES PHOSPHATASES ACIDES EPIDERMIQUES -

- COMPARAISON DES KI DES DIFFERENTS SELS DE BENZYL THIO 2 ETHYLAMINE (BTE) -

TABLEAU III (FIN)

		Ki
HOOC–CHOH–CHOH–COOH	Acide tartrique	$1,4.10^{-5}$ M
HOOC–CHOH–CH_2–COOH	Acide malique	$1. 10^{-3}$ M
HOOC–CH_2–CH_2–COOH	Acide succinique	∞
	Acide salicylique	∞

- INHIBITION DES PHOSPHATASES ACIDES EPIDERMIQUES -

- Ki DE QUELQUES AGENTS SALIFIANTS DU BTE -

TABLEAU IV

On note, également, un léger effet potentialisateur du malate qui, employé seul, donne un Ki de 1.10^{-3} mole.
Les constantes d'inhibition, consignées dans le tableau IV, montrent que ce n'est pas la partie salifiante de la molécule qui est active mais la benzyl-thio-2-éthylamine.

5-2 Influence du radical fixé sur la cystéamine (Tableau V)

Le chlorhydrate de cystéamine est sans action sur les phosphatases acides ; le soufre ne doit donc pas être sous la forme d'un thiol.
Si l'on substitue l'hydrogène du groupement SH par le radical méthyle, l'activité est également nulle ; de même, le radical méthylène, ne confère pas d'activité à la molécule.
Par contre, le remplacement de l'hydrogène du thiol par les groupements : benzyle, allyle, thényle , méthylénedioxybenzylidène et tous autres groupements "réservoirs d'électrons π " confèrent une bonne activité antiphosphatasique à la molécule.
Si le remplacement de l'hydrogène du SH par un groupement isothiouronium, groupement donneur d'électrons, permet de conserver une bonne activité à la molécule, par contre, le remplacement de cet hydrogène par des groupements attracteurs d'électrons, comme CH_2OH, COOH, fait perdre toute activité antiphosphatasique à la molécule.

Ainsi, en règle générale, l'activité antiphosphatasique semble liée à la présence d'un radical fortement donneur d'électrons dans sa molécule.
Remarquons, enfin, qu'un alourdissement du radical benzyle, comme dans les cas du dichlorhydrate de méthylènedioxybenzylidènedithioéthylammonium ou du dichlorhydrate d'hydroxyméthoxybenzylidènedithioéthylammonium, confère à la molécule une très légère perte d'activité vis-à-vis des phosphatases acides.

5-3 Influence du soufre cystéaminique sur l'activité antiphosphatasique

Le tableau VI montre que les Ki des formes chlorhydrate et malate de la benzyloxy-2-éthylammonium sont sensiblement augmentés lorsque le soufre est remplacé par un oxygène. En effet, on passe de 2,9 à $10,5.10^{-4}$ moles pour la forme chlorhydrate et de 2,2 à $5,5.10^{-4}$ mole pour la forme malate lorsque les atomes de soufre sont remplacés par des atomes d'oxygène.

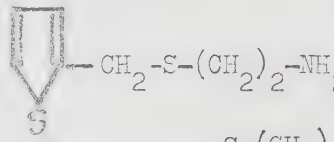
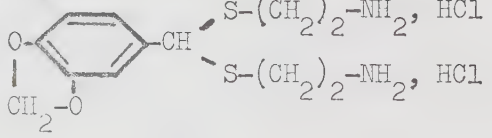
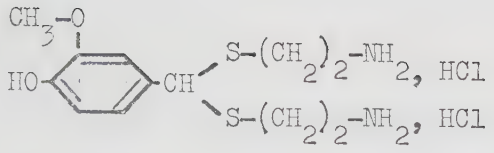
		Ki
• $HS-CH_2-CH_2-NH_2$, HCl	Chlorhydrate de cystéamine	∞
• $CH_3S-(CH_2)_2-NH_2$, HCl	Chlorhydrate de méthylcystéamine	∞
• $CH_2(S-(CH_2)_2-NH_2, HCl)(S-(CH_2)_2-NH_2, HCl)$	Dichlorhydrate de méthylènedithio-2,2'bis éthylamine	∞
• $CH_3C(CH_3)(S-CH_2-CH_2-NH_2, HCl)(S-CH_2-CH_2-NH_2, HCl)$	Dichlorhydrate d'isopropylidènedithio 2,2'bis éthylamine	$4,5.10^{-4}M$
• $C_6H_5-CH_2-S-(CH_2)_2-NH_2$, HCl	Chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine	$2,9.10^{-4}M$
• $CH_2=CH-CH_2-S-(CH_2)_2-NH_2$, $HOOC-CHOH-CH_2-COOH$	Malate d'allyl thio-2-Ethylamine	$2,5.10^{-4}M$
•  $-CH_2-S-(CH_2)_2-NH_2$, HCl	Chlorhydrate de S thényle cystéamine	$3,9.10^{-4}M$
•  $(S-(CH_2)_2-NH_2, HCl)(S-(CH_2)_2-NH_2, HCl)$	Dichlorhydrate de méthylènedioxy 3-4 benzylidène dithioéthylammonium	$4,5.10^{-4}M$

TABLEAU V

• 	Dichlorhydrate d'hydroxyméthoxy 3 benzylidène dithio 2,2'bis éthylammonium	$6,1.10^{-4}$M
• $HN=C(NH_2)-S-(CH_2)_2-NH_2$, HCl	Chlorhydrate de β aminoéthylisothio-uronium	$5,4.10^{-4}$M
• $HO-CH_2-CH_2-S-(CH_2)_2-NH_2$, HCl	Chlorhydrate d'aminoéthylthio 2 éthanol	∞
• $HOOC-CH_2-S-(CH_2)_2-NH_2$, HCl	Chlorhydrate de carboxyméthyl-cystéamine	∞

- INHIBITION DES PHOSPHATASES ACIDES EPIDERMIQUES -

- INFLUENCE DU RADICAL FIXE SUR LA CYSTEAMINE (36) -

TABLEAU V (FIN)

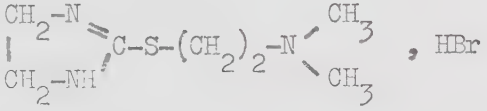
		Ki
. $HOOC-CHOH-CH_2-COOH$, $H_2N-(CH_2)_2-O-CH_2-C_6H_5$	Malate de benzyl oxy-2-éthylamine	$5,5.10^{-4}M$
. HCl, $H_2N-(CH_2)_2-O-CH_2-C_6H_5$	Chlorhydrate de benzyl oxy-2-éthylamine	$10,5.10^{-4}M$

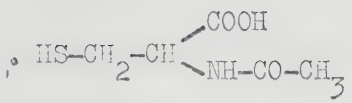
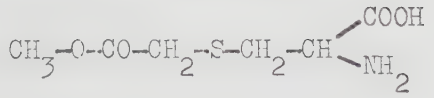
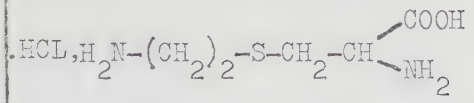
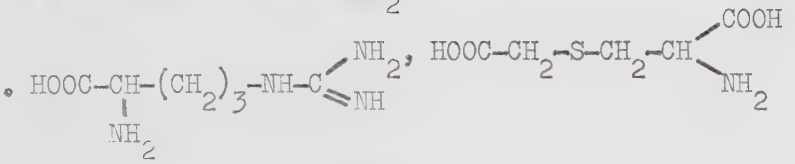
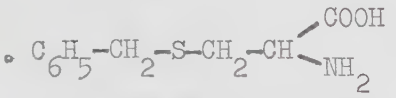
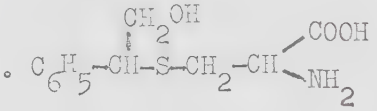
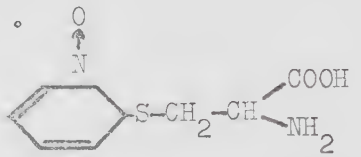
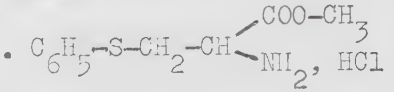
- INHIBITION DES PHOSPHATASES ACIDES EPIDERMIQUES -

- IMPORTANCE DU SOUFRE DANS L'ACTIVITE ANTIPHOSPHATASIQUE (36) -

TABLEAU VI

TABLEAU VII

		Ki
• $C_6H_5-CH_2-S-(CH_2)_2-NH-CH_3$, HCl	Chlorhydrate de benzyl thio-2-méthylamine	$4,1.\ 10^{-4}M$
• $C_6H_5-CH_2-S-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$, HCl	Chlorhydrate de benzyl thio-2-diméthylamine	$3,75.10^{-4}M$
• $C_6H_5-CH_2-S-(CH_2)_2-N^{+}(CH_3)_3$, $^{-}SO_4CH_3$	Sulfométhylate de benzyl thio-2-triméthylammonium	∞
•  , HBr	Bromhydrate de β diméthylammonium éthyl thio 2 imidazolinium	∞
• $C_6H_5-CH_2-S-(CH_2)_3-NH_2$, HCl	Chlorhydrate de benzyl thio-2-propylamine	$12.10.^{-4}M$
• $C_6H_5-CH_2-SH$	Benzyl mercaptan	∞
• $C_6H_5-CH_2-S-S-CH_2-C_6H_5$	Benzyl-S-S-Benzyl	∞
• $HS-CH_2-CH(NH_2)COOH$, HCl	Chlorhydrate de cystéine	∞

• 	N.acétylcystéine	∝
• 	S.Méthoxycarbonylméthyl-L-cystéine	∝
.HCL, 	Monochlorhydrate de thialysine	∝
• 	Carboxyméthylcystéinate d'arginine	∝
• 	S benzylcystéine	∝
• 	S(hydroxy-2-phényl-1-éthyl)L-cystéine	40.10^{-4}M
• 	Pyridine N-oxyde-S-cystéine	$26,5.10^{-4}$M
• 	Chlorhydrate de S benzyl-cystéinate de méthyle	8.10^{-4}M

- IMPORTANCE DE LA FONCTION AMINE DANS L'ACTIVITE ANTIPHOSPHATASIQUE (36) -

TABLEAU VII

(FIN)

Ce résultat ne surprend pas puisque le soufre et l'oxygène sont deux isostères. Néanmoins, le fait que les molécules soufrées soient plus actives vis-à-vis des phosphatases que les molécules contenant un atome d'oxygène peut indiquer une certaine potentialisation due au soufre.

5-4 Importance de la fonction amine sur l'activité antiphosphatasique (Tableau VII)

L'observation des constantes d'inhibition des molécules consignées sur le tableau VII permet de conclure que l'absence de la fonction amine fait perdre toute activité antiphosphatasique.
On remarque que l'on conserve une bonne valeur de Ki dans le cas d'amines secondaires ou tertiaires. Dans ce dernier cas, la présence d'un noyau imidazoline au lieu du noyau benzyle ne semble pas très favorable.
La constante d'inhibition est infinie avec un ammonium quaternaire. Il apparaît donc, que, si l'azote tertiaire n'est pas conservé, la molécule perd son activité antiphosphatasique. La distance soufre-NH_2 semble également importante : dans le cas de 3 carbones entre S et NH_2 , on enregistre une augmentation relativement importante de la valeur de Ki, donc baisse d'activité.
L'importance du groupement éthylamine est d'ailleurs une propriété pharmacologique assez générale de certains composés de type spasmolytique, sympathicomimétique, sympatho et parasympatholytique, antihistaminique (83).
L'activité antiphosphatasique nulle de dérivés cystéiniques, comme le chlorhydrate de cystéine, la N acétylcystéine, le monochlorhydrate de thialysine etc... peut s'expliquer par le fait que, comme dans le cas de certains dérivés cystéaminiques, vus plus haut, nous n'avons pas de groupes réservoirs ou donneurs d'électrons susceptibles de potentialiser l'effet de la molécule vis-à-vis des phosphatases acides.
Par contre, avec des dérivés, tels que la S.benzylcystéine, la S (hydroxy-2-phénylethyl) L cystéine etc.... nous pouvions espérer avoir de bonnes valeurs des constantes d'inhibition. En fait, l'activité antiphosphatasique de ces molécules est nulle.

		Ki
• $C_6H_5-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH_2$, $HOOC-CH_2-S-CH_2-CH(NH_2)(COOH)$	Carboxyméthylcystéinate de benzyl thio 2 éthylamine	$3,9.10^{-4}$M
• $HOCH_2-CH_2-NH_2$	Ethanolamine	∞
• $HS-CH_2-CHOH-CH_2OH$	Thioglycérol	∞
• $HOOC-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH_2$	Carboxyméthylcystéamine	∞

- INHIBITION DES PHOSPHATASES ACIDES EPIDERMIQUES -

- ACTION DE QUELQUES DERIVES SOUFRES SUR L'ACTIVITE DES PHOSPHATASES ACIDES -

TABLEAU VIII

Ceci peut s'expliquer par le fait que ces composés se trouvent à l'état de Zwittérion $R-CH\begin{cases}COO^- \\ NH_3^+\end{cases}$.

Dans ces conditions, la fonction amine dans le cas des cystéinates est sinon perdue du moins trés affaiblie.
En revanche, lorsque la fonction carboxylique est méthylée, la molécule perd son caractère amphotère, l'azote tertiaire est conservé et on observe une bonne valeur du Ki ; c'est le cas du S.benzyl cystéinate de méthyle où l'on obtient $Ki = 8.10^{-4}$ moles, valeur assez élevée, mais cependant correcte.
En fait, ce dernier dérivé est improprement appelé dérivé de la cystéine, en effet, on est trés proche de la basicité de la cystéamine avec ce composé.

5-5 Action de quelques dérivés soufrés divers sur l'activité des des phosphatases acides (Tableau VIII)

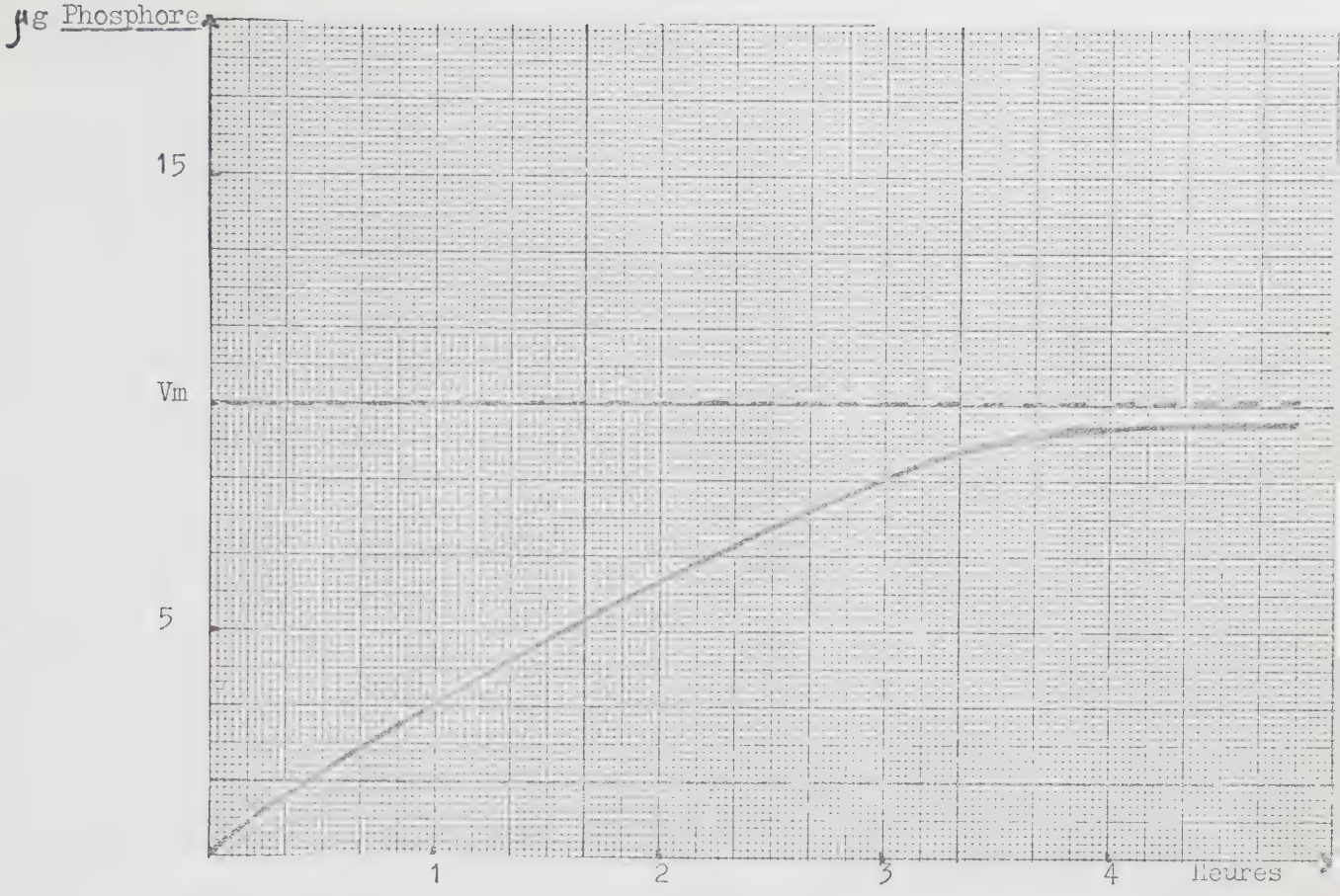
On trouve $Ki = 3,9.10^{-4}$ M pour le carboxyméthylcystéinate de benzyl-thio-2-éthylamine. On peut considérer à la lumière des expériences précédentes que c'est la partie droite cystéaminique de la molécule qui confère à ce composé une bonne activité anti-phosphatasique. L'éthanolamine et le thioglycérol ont des Ki infinis, ce sont donc de mauvais inhibiteurs des phosphatases ; ces résultats sont tout à fait logiques. De même, le Ki infini de la carboxyméthyl-cystéamine est logique puisque, d'une part la présence de COOH au lieu d'un groupement donneur d'électrons fait perdre toute activité à la molécule et, d'autre part, celle-ci se comporte en milieu acide comme une base et prend la forme dissociée:
$^-OOC-CH_2-S-(CH_2)_2-NH_3^+$ ce qui fait perdre la fonction amine.

6) ACTION DE QUELQUES DERIVES SOUFRES SUR UN SUBSTRAT α GLYCEROPHOSPHATE

6-1 Vitesse de la réaction

Dans cette expérience, on suit la libération d'acide orthophosphorique à partir d'un substrat α glycérophosphate en fonction du temps à pH 5,4 pour une quantité de 640 γg de protéines/ml de solution enzymatique ;

FIGURE 11



ACTION DES PHOSPHATASES ACIDES SUR L' α GLYCEROPHOSPHATE

FIGURE 12

ACTION DU MALATE BTE SUR LES PHOSPHATASES ACIDES AVEC LE SUBSTRAT α GP

la concentration finale en α glycérophosphate étant de $2,0.10^{-4}$M dans le milieu d'incubation.

L'étude en fonction du temps de la quantité de phosphore libéré à partir de l'α glycérophosphate montre qu'à t = 2 heures on est à $\frac{Vm}{2}$. On choisira donc ce temps pour la durée de l'incubation (figure 11).

6-2 Etude du Ki du malate de BTE dans ces conditions:

Le coefficient d'inhibition de l'activité des phosphatases acides sur un substrat α glycérophosphate en présence de malate de BTE est de 2.10^{-4}moles ; le Ki est de $2.2.10^{-4}$moles avec le β glycérophosphate. Ce résultat confirme que les phosphatases acides, d'une part, ne sont pas trés spécifiques et d'autre part, montre qua la molécule soufrée peut se lier également à différentes phosphatases pour les inhiber (figure 12).

Chapitre IV

DISCUSSION - CONCLUSIONS

L'ensemble de ces résultats démontre que certaines molécules soufrées inhibent la réaction d'hydrolyse catalysée par les phosphatases acides de l'épiderme de rat. Il n'existe, en fait, aucune action directe de ces molécules sur le substrat, mais une fixation de certains dérivés soufrés sur les phosphatases acides. Cette fixation se fait indépendamment de la formation du complexe enzyme-substrat. Ceci démontre que sur les phosphatases acides engagées dans de telles réactions déphosphorylantes, il existe au moins deux sites de fixation bien distincts : un sur lequel va se lier le substrat et un autre où l'inhibiteur doit également pouvoir se fixer.

$$[S]+[E] \rightleftharpoons [SE] + [I] \longrightarrow [SEI]$$

La formation de ce complexe substrat-enzyme-inhibiteur est irréversible et ainsi il y a donc inhibition par certaines molécules soufrées de la réaction déphosphorylante du substrat catalysée par les phosphatases : l'inhibition est de type non compétitif absolu.

Nous avons pu préciser, en comparant les constantes d'inhibition de différentes molécules soufrées, qu'un certain nombre de conditions sont nécessaires pour obtenir une bonne inhibition. On obtient les meilleurs résultats avec les dérivés de la benzyl-thio-2-éthylamine. Les différents Ki sont voisins quel que soit le sel employé pour salifier ces molécules. Le radical benzyle n'est pas absolument nécessaire à l'activité anti-phosphatasique ; il peut être substitué par tout autre noyau ou radical comportant une double liaison ou une chaîne ramifiée : en règle générale, par tout groupement donneur d'électrons.

Les constantes d'inhibition sont meilleures avec l'atome de soufre qu'avec l'atome d'oxygène, ceci justifie l'emploi préférentiel des dérivés du soufre dans notre étude.

La fonction amine semble jouer un rôle capital dans l'activité de ces molécules ; la fonction basique doit être conservée. En effet, toute perte ou affaiblissement de la basicité des molécules entraînent des constantes d'inhibition qui tendent vers l'infini, c'est ce que l'on obtient, en particulier, avec certains dérivés de la cystéine dans le mécanisme d'action mis en évidence dans cette expérimentation. On peut donc penser que l'amine est un des sites actifs du complexe substrat-enzyme-inhibiteur. Le doublet libre de l'amine n'entrerait donc pas en jeu dans le sens donneur d'électrons, mais servirait à l'établissement d'une liaison entre l'enzyme et l'inhibiteur déterminant ainsi le site actif de la liaison. Une distance de 2 carbones entre le soufre et l'amine est nécessaire.

Si maintenant, on revient au tableau de la synthèse des lipides (figure 9 - 1ère partie - page 40) on s'aperçoit que l'inhibition des phosphatases acides peut expliquer l'inhibition de l'incorporation d'oléate de sodium dans les triglycérides, comme nous l'avons constaté dans la première partie.

En effet, en inhibant la déphosphorylation des acides phosphatidiques par action sur les phosphatases, des substances telles que les sels de benzyl-thio-2-éthylamine, peuvent empêcher d'aboutir à la formation de triglycérides puisque la déphosphorylation de ces acides selon le schéma classique semble obligatoire avant la fixation du troisième acylCoA sur l'alcool primaire rendu alors libre. Dans cette hypothèse, le fait d'observer une synthèse accrue des phospholipides associée à l'action du BTE sur les phosphatases entraîne que l'anabolisme des phospholipides doit s'effectuer préférentiellement par une voie qui ne fait pas intervenir de déphosphorylation comme celle de BREMER et GREENBERG, par exemple.

Remarquons pour terminer qu'il existe une bonne corrélation entre l'inhibition de l'incorporation d'oléate de sodium dans les graisses neutres et la valeur de la constante d'inhibition des phosphatases acides : ainsi, les molécules inhibitrices de la lipogénèse sont de bons inhibiteurs des phosphatases acides.

Par contre, une molécule soufrée telle que la pyridine-S cystéine N oxyde qui a une action médiocre vis-à-vis des phosphatases n'inhibent pas non plus l'incorporation d'oléate de sodium dans les triglycérides : c'est également le cas de la thio-2-éthylamine, de la S méthoxycarbonyl méthylcystéine etc..... . Le ou les mécanismes d'action de telles molécules sur l'inhibition de la production de sébum seraient donc différents et nos constatations n'excluent pas les propriétés qui ont été attribuées à ces molécules.

- 3ème Partie -

. DISTRIBUTION ET DEVENIR METABOLIQUE DE LA S. CARBOXYMETHYL CYSTEINE ET DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE CHEZ LE RAT .

Chapitre I

INTRODUCTION

Ces dernières années les travaux consacrés à l'étude du métabolisme des médicaments après leur introduction dans l'organisme se sont multipliés.

Pour le biologiste, le médecin et le chimiste, il est nécessaire de connaître avec précision la distribution transitoire d'une molécule introduite dans l'organisme, son élimination ainsi que celle de ses métabolites que l'on essayera d'identifier.

Les informations recueillies en fonction du temps permettent de saisir l'aspect dynamique des transformations, d'élucider le mécanisme d'action du médicament et d'établir enfin certaines relations entre structure de la molécule et activité biologique. Eventuellement, une telle étude peut permettre de découvrir des médicaments nouveaux.

Ces études ont été rendues possibles par l'utilisation des molécules marquées et l'évolution des techniques analytiques. En effet, le développement des techniques nucléaires permet une détection aisée, précise et rapide de la radioactivité localisée dans les différents organes de l'animal. Cependant, si les techniques nucléaires apportent des renseignements qu'elles seules peuvent donner, elles doivent, en outre, être associées aux méthodes analytiques classiques : chromatographie en couche mince, sur papier ou en phase gazeuse, spectrométrie infrarouge et résonance magnétique nucléaire.

Sans une telle étude nous avons pensé que notre recherche sur le mécanisme d'action des dérivés soufrés, en particulier, dans le métabolisme des lipides aurait été incomplète.

C'est pourquoi, dans cette troisième partie, nous nous proposons d'étudier la distribution et le devenir métabolique de deux des molécules types étudiées :

. une de la série cystéine : la S. carboxyméthylcystéine.

. une autre de la série cystéamine : le Chlorhydrate de benzyl thio.2-éthylamine.

L'expérience est réalisée chez le rat à l'aide de produits marqués, soit au soufre 35, soit au carbone 14.

Chapitre II

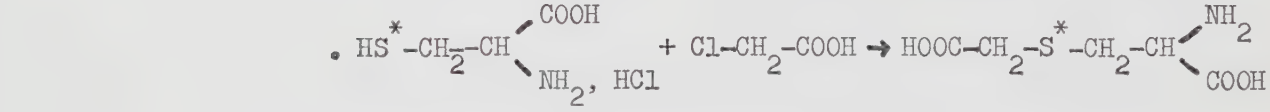
MATERIEL ET METHODES

1) PREPARATION ET CONTROLE DES MOLECULES INJECTEES (36)

Les molécules actives utilisées au cours de cette expérimentation ont été synthétisées par nos soins à partir de différents précurseurs fournis par le C.E.A de SACLAY.

1-1- Synthèse de la ^{35}S. Carboxyméthylcystéine (84) = CMC.^{35}S.

Par action du chlorhydrate de ^{35}S.cystéine sur l'acide monochloracétique on obtient la ^{35}S. Carboxyméthylcystéine.



Le rendement de la synthèse est de 77 % . La pureté du produit n'est que de 83 % malgré les cristallisations effectuées pour le purifier après synthèse (voir les résultats de l'autoradiogramme pages 100 et 102).
On obtient ainsi 131 mg de ^{35}S. CMC d'activité spécifique 23 µCi/mg au jour de l'utilisation.

1-2- Synthèse du chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine ^{35}S = BTE.^{35}S (85)(86)

Par action du benzyl mercaptan ^{35}S sur la bromoéthylamine, on obtient la benzylcystéamine.^{35}S qui, en milieu chlorhydrique, donne le chlorhydrate de benzyl thio 2 éthylamine.^{35}S .

• $C_6H_5-CH_2-{}^{*}SH + Br-CH_2-CH_2-NH_2 \rightarrow C_6H_5-CH_2-{}^{*}S-CH_2-CH_2-NH_2 + HBr$

• $C_6H_5-CH_2-{}^{*}S-CH_2-CH_2-NH_2 + HCl \rightarrow C_6H_5-CH_2-{}^{*}S-CH_2-CH_2-NH_2, HCl$

Après purification par cristallisation et passage sur Séphadex G.10 la pureté du produit est de l'ordre de 95 % (voir les résultats de l'autoradiogramme pages 112 et 114).
On obtient 24 mg de BTE ^{35}S d'activité spécifique 25 µCi/mg au jour de l'utilisation.

1-3- Synthèse du chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine 1,2 ^{14}C (85)(86) = BTE.^{14}C

Par action du chlorhydrate ^{14}C éthanolamine sur le chlorure de thionyle on obtient le chlorhydrate de chloroéthylamine ^{14}C qui, par réaction avec le benzyl mercaptan conduit à la formation de la benzyl cystéamine ^{14}C. Ce dernier composé en milieu chlorhydrique donne du chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine 1,2 ^{14}C.

• $HCl, H_2N-{}^{*}CH_2-{}^{*}CH_2-OH + SOCl_2 \rightarrow HCl, H_2N-{}^{*}CH_2-{}^{*}CH_2-Cl + SO_2\uparrow + HCl$

• $HCl, H_2N-{}^{*}CH_2-{}^{*}CH_2-Cl + HS-CH_2-C_6H_5 \rightarrow C_6H_5-CH_2-S-{}^{*}CH_2-{}^{*}CH_2-NH_2 + HCl$

• $C_6H_5-CH_2-S-{}^{*}CH_2-{}^{*}CH_2-NH_2 + HCl \rightarrow C_6H_5-CH_2-S-{}^{*}CH_2-{}^{*}CH_2-NH_2, HCl$

Le rendement de la synthèse est de 72 %. Aprés purification par cristallisation la pureté du produit est de l'ordre de 92 % (voir les résultats de l'autoradiogramme pages 126 et 127).
On obtient 292 mg de chlorhydrate de BTE 1,2 ^{14}C d'activité spécifique 2,33 µCi/mg.

2) TECHNIQUES BIOLOGIQUES UTILISEES AU COURS DE CES ETUDES

2.1- Conditions d'administration et d'expérimentation

Dans certaines expériences, les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de la molécule marquée en solution dans du sérum physiologique.

Le volume maximum injecté est de 0,5 ml. La concentration des solutions administrées sera précisée à propos de chaque expérience. Après injection, les animaux sont placés dans des cages à métabolisme permettant de recueillir les urines émises et ceci pendant des temps variant de 15 minutes à 48 heures, temps au bout desquels les animaux sont sacrifiés par décapitation. On dispose de 3 animaux par série.

Dans d'autres études, les rats sont anesthésiés à l'éthyluréthane (injection IP 1 g/kg). Les molécules en solution aqueuse sont alors administrées par voie topique. Un volume de 0,5 ml est appliqué à l'aide d'une seringue sur une aire dorsale tondue de 5 x 5 cm. Les rats sont couchés sur des tubes permettant de recueillir l'urine émise pendant la durée variable de cette phase expérimentale in vivo.

2-2 Prélèvement des tissus et organes

Les animaux sont sacrifiés par décapitation, le sang est recueilli et le sérum récupéré par centrifugation après rétraction du caillot. Les urines émises pendant l'expérimentation sont recueillies et on y ajoute l'urine prélevée directement dans la vessie au moment du sacrifice.
Différents organes sont également prélevés : la peau dorsale est tondue, séparée du rat, débarrassée des panicules musculaires et adipeux sous-cutanés, les poils sont récupérés ; l'épiderme est séparé du derme par grattage à la lame de rasoir.
Les différents organes du rat sont extirpés dans l'ordre suivant : foie, rate, reins, estomac, intestins, poumon, coeur ..... .
En attendant les analyses, les tissus sont conservés à -25°C.

3) TECHNIQUES ANALYTIQUES

3-1 Chromatographie sur papier

La chromatographie de partage sur papier Arches 304 (29 x 46) a permis de contrôler la pureté des produits administrés et de mettre en évidence les différents métabolites urinaires après injection intrapéritonéale de la molécule étudiée.

Les produits, radioactifs ou non, en solution dans de l'eau ou de l'urine (20 ou 30 µl) sont déposés en "spot" de 5 mm de diamètre le long d'une ligne de départ tracée à 9 cm de l'extrémité du papier. La distance entre les dépôts est de 3 cm.
Les produits à analyser sont alors soumis pendant une nuit à la chromatographie descendante dans un local dont la température est de 23° C et l'humidité 70 %.
On utilise comme solvant le mélange butanol-acide acétique-eau 4/1/5. Ce mélange présente 2 phases facilement décantables. On sature la cuve 24 heures avant son utilisation avec la phase aqueuse, la phase organique servant d'éluant.
La chromatographie est stoppée quand le front du solvant atteint 32 à 35 cm. Dans ces conditions, 20 ml de la phase organique suffisent pour assurer une parfaite imbibition du chromatogramme.

Pour mettre en évidence les fonctions des métabolites radioactifs ou non sur les chromatogrammes, nous avons utilisé différents réactifs de révélation :

3-1.1 Réactif à la ninhydrine.

Le mélange 250 mg de ninhydrine dans du butanol-acide acétique à 10 % (95/5) pulvérisé sur le chromatogramme révèle après séjour de ce dernier à l'étuve (10 minutes à 105° C) sous forme de taches violettes les fonctions amines.

3-1.2 Réactif à l'iodoplatinate de potassium.

La pulvérisation sur le chromatogramme d'un mélange V/V d'une solution aqueuse d'iodure de potassium à 1,1 % et d'une solution de chlorure de platine à 0,135 % révèle après exposition aux vapeurs d'acide chlorhydrique les thioéthers.

3-1.3 Réactif à la diméthylaminobenzaldéhyde

On dissout 1 g de 4 diméthylaminobenzaldéhyde dans :
. 30 ml d'éthanol
. 3 ml d'acide chlorhydrique (d = 1,19) et
.180 ml de 1-butanol.
Les arylamines se révèlent en jaune après pulvérisation du mélange sur le chromatogramme.

3-1.4 Réactif au N-naphtyléthylène diamine.

On pulvérise un premier réactif à 0,2 % de nitrite de sodium en solution dans HCl 0,1 N. Après séchage rapide du chromatogramme, on pulvérise à nouveau sur celui-ci une solution aqueuse de chlorure de N-naphtyléthylène diammonium à 0,2 %. Les produits correspondants aux arylamines sont alors révélés.

3-1.5 Réactif au glucose/acide phosphorique

On pulvérise sur le chromatogramme une solution de 2 g de glucose dans 10 ml d'acide orthophosphorique (d = 1,70) à laquelle on ajoute :

- 40 ml d'eau
- 30 ml d'éthanol et
- 30 ml de butanol.

On révèle ainsi en gris les amines aromatiques après un séjour de 10 minutes à l'étuve réglée à 105° C.

3-1.6 Réactif diéthylamine sulfate de cuivre

On dissout 0,5 g de sulfate de cuivre dans 100 ml de méthanol et on ajoute 3 ml de diéthylamine à la solution.
L'aspersion du chromatogramme par cette solution donne des taches vertes au niveau des thio-acides.

3-1.7 Réactif au nitroprussiate de sodium

On dissout 10 g de nitroprussiate de sodium dans 100 ml d'eau, puis on ajoute à la solution :

- 2 ml de soude à 33 % et
- 5ml de permanganate de potassium à 1,58 %.

Après pulvérisation de cette solution sur le chromatogramme, l'examen à la lumière ultra-violette permet de visualiser les sulfonamides.

3-1.8

Pour terminer, précisons que les Rf des différentes taches, ainsi révélées, sont calculés en déterminant le rapport hauteur de migration du produit mesuréà sa base sur hauteur de migration du solvant.

3-2 Minéralisation des tissus avant comptage-radioactivité

Pour mesurer la radioactivité des tissus comme la peau, les poils, les différents organes de l'animal, son sérum et même dans certains cas les zones actives des chromatogrammes, il est nécessaire de minéraliser les échantillons prélevés.

3-2.1 Minéralisation de PIRIE pour le comptage du ^{35}S (87).

Les tissus des rats ayant reçu des molécules ^{35}S sont minéralisés selon la méthode de PIRIE qui permet d'aboutir à la formation de sulfate de magnésium comptable en scintillation liquide.
Le réactif de PIRIE est un mélange V/V d'acide nitrique concentré et d'acide perchlorique à 60 % saturé avec du nitrate de magnésium.
Ce réactif permet de minéraliser par ml jusqu'à 250 mg de tissu ou 0,5 ml de sérum en chauffant au bain de sable à 260-280° C jusqu'à obtention d'un résidu blanc.
Après refroidissement à 100° C, on ajoute alors 1 ml de glycérol chaud qui dissout les cendres issues de la minéralisation. Après dissolution complète, les flacons sont refroidis et on ajoute 6 ml d'un mélange éthanol/diméthylformamide 1/3. On peut alors déterminer l'activité des échantillons après addition de 10 ml du mélange scintillant au toluène PPO, diméthyl-POPOP défini dans la première partie (page 18).

3-2.2 Minéralisation au "Soluène" pour la mesure du ^{14}C.

On peut minéraliser 80 à 100 mg de tissus de rat ayant reçu des molécules marquées au carbone 14 en utilisant 1 ml de "Soluène-Packard."
Les flacons bien bouchés sont placés quelques heures à l'étuve à 60° C jusqu'à obtention d'une solution incolore, puis on les laisse refroidir.
L'addition de 13 à 14 ml du scintillant suivant :

- Toluène ..... 1 litre
- Naphtalène ..... 100 g
- PPO ..... 10 g
- Diméthyl-POPOP . 250 g

permet de déterminer la radioactivité présente dans les tissus minéralisés.

3-3 Mesure de la radioactivité

On distinguera 2 types de mesure :

- Les mesures de radioactivité par scintillation liquide et
- les mesures de radioactivité par balayage lent d'une sonde au-dessus du chromatogramme.

3-3.1 Mesure par scintillation liquide.

Au cours des études sur le renouvellement des molécules soufrées, nous avons utilisé, soit un appareil Tritomat I.D.L. dont les caractéristiques ont été précisées page 18, soit un appareil Packard Tri-Carb modèle 3320 qui présente l'avantage de déterminer le rendement de la mesure par standardisation externe. Cette méthode consiste à mesurer à l'aide d'une source γ de ^{241}Am et ^{226}Ra d'activité connue, extérieure au flacon de comptage, le déplacement du spectre vers les régions de basse énergie et à attribuer un indice d'atténuation du rendement à chaque échantillon.

En pratique, pour déterminer le rendement d'un comptage il suffit de se reporter à une courbe d'étalonnage : rendement en fonction du degré d'atténuation, courbe établie à l'aide d'une série de standards d'activité connue et présentant différents degrés d'atténuation de rendement.

Pour les tissus minéralisés, les liquides scintillants employés sont ceux décrits aux paragraphes 3-2.1 et 3-2.2 .

Pour les liquides organiques, comme les urines ou le sérum, on mesure l'activité en employant le scintillant "Instagel-Packard" qui permet de déterminer l'activité contenue dans 0,2 à 0,5 ml.

La durée du comptage varie avec l'activité contenue dans les échantillons, elle se situe entre 1 et 30 minutes.

3-3.2 Mesure de radioactivité par compteur proportionnel.

On utilise un compteur de type Geiger-Müller, muni d'une fenêtre en "millar". Les rayons émis par la source (le chromatogramme) sont captés par le compteur placé au-dessus de cette source. La sonde est sous pression d'hélium 95 % - butane 5 % de façon à créer un courant d'ionisation proportionnel aux rayons détectés lorsque l'appareil est sous une tension de 1.050 volts.

La fenêtre en "millar" est munie d'un diaphragme dont la fente mesure 20 x 2 mm. Les rayonnements détectés sont, après amplification, enregistrés sous forme de pics sur un enregistreur à vitesse de déroulement du papier variable.

Le chromatogramme est fixe, la sonde est mobile et sa vitesse de balayage varie de 0,5 mm à 2 cm par minute (88).

Le temps d'intégration et l'échelle de sensibilité de l'intégrateur sont également variables.
Le rendement de l'appareil est de l'ordre de 30 % avec le carbone ou le soufre.
Après expérimentation, la surface des pics est mesurée et le résultat final est exprimé en pourcentage de l'activité totale du chromatogramme.

3-4 Autoradiographies

Nous distinguerons les autoradiographies de chromatogramme et les autohistoradiographies.

3-4.1 Autoradiochromatographies

Cette technique a déjà été détaillée dans le chapitre "Matériel et Méthodes" dans la première partie. On pourra s'y rapporter à la page 17 .

3-4.2 Autohistoradiographies

Par cette méthode on peut repérer dans une cellule une molécule marquée injectée dans l'organisme.
Cette technique a été décrite par APPLETON (89), CARO (90), ROGERS (91), JOFTES (92).
Les grains d'argent d'émulsion ultrasensibles sont réduits par les rayons émis par les isotopes radioactifs, incorporés dans les tissus d'animaux. Après fixation de ces tissus au mélange de CARNOY, déshydratation progressive à l'alcool et inclusion dans de la paraffine, les les blocs sont débités au microtome et les coupes collées sur des lames de verre (ILFORD KODAK). Les tissus sont ensuite déparaffinés au toluène puis réhydratés.
En chambre noire, l'ensemble lames-tissus est ensuite plongé quelques instants dans du gel ILFORD K 5 dont la température est maintenue à 50 °C.
Les préparations sont conservées à + 4° C, en chambre noire, pendant un temps qui peut varier de quelques jours à plusieurs mois selon l'activité contenue dans la coupe.
Après ce temps de contact entre les tissus et le gel, on révèle les préparations avec le révelateur LX 24 KODAK, dilué 5 fois.
Après rinçage à l'eau acétique à 2 %, on fixe les coupes à l'aide du fixateur AL 4 KODAK, dilué 4 fois. Après lavage abondant à l'eau, les préparations sont colorées au bleu de Toluidine.

Les grains d'argent réduits par les rayons β sont alors localisés dans les tissus et comptés sur une surface donnée.

4) EXPRESSION DES RESULTATS

Dans tous les cas, l'activité spécifique est exprimée en dpm/mg de tissu ou ml de liquide biologique. L'activité totale est exprimée en dpm ou en pourcentage de l'activité totale injectée à l'animal.
Dans le calcul des activités totales, nous avons admis que le sérum d'un rat de 150 g représentait environ 7 ml.
L'activité totale des urines est déterminée en multipliant l'activité trouvée par ml par le volume réel recueilli (urine émise + urine de la vessie).
L'activité totale de la peau, du derme et de l'épiderme a été calculée en multipliant respectivement les activités spécifiques par 15.000, 12.000 et 3.000, une série de mesures nous a, en effet, montré que la peau totale d'un rat de 150 g correspondait au 1/10 de ce poids, soit 15 g, le derme à 12 g et l'épiderme à 3 g . (les rats utilisés pesaient 150 g.)

Les résultats exprimés dans les tableaux et figures sont les moyennes de mesures effectuées sur les 3 rats de chaque série pour plusieurs prises d'essai ; les variations individuelles, estimées non significatives, ne figurent pas dans la présentation des résultats.

Enfin, la période du soufre étant de 86,7 jours, les activités totales et spécifiques des molécules marquées ^{35}S sont rapportées au jour de l'injection quel que soit le jour où la détermination d'activité a été effectuée.

Chapitre III

DISTRIBUTION ET DEVENIR METABOLIQUE DE LA ^{35}S.CARBOXYMETHYLCYSTEINE (CMC.^{35}S) CHEZ LE RAT

1) TRANSPORT SERIQUE ET ELIMINATION RENALE DE LA ^{35}S CARBOXYMETHYLCYSTEINE APRES INJECTION IP DE 50 µCi

Les figures 1 et 2 illustrent les résultats (par ailleurs rapportés dans le tableau I) des mesures de l'activité de la CMC.^{35}S ou de ses métabolites, d'une part dans le sérum sanguin et d'autre part dans les urines après injection IP de 50 µCi.
Les rats ayant uriné pendant l'injection, nous avons retrouvé éprouvettes et vessies vides dans les séries quinze et trente minutes au moment du sacrifice.

Le transport de la CMC dans le sang en fonction du temps se traduit par une courbe d'allure asymptotique. Si la décroissance d'activité est trés rapide au niveau sérique pendant les premières heures, on remarque qu'ensuite une certaine activité se maintient pendant plusieurs heures voire quelques jours après l'injection. Ce résultat suggère que certains organes conservent une certaine activité pendant toute cette période et que l'élimination du produit au niveau de ces organes serait trés lente. (Une expérience non développée ici a montré par la technique d'autoradiographies de souris entières ayant reçu le produit ^{35}S que le thymus, par exemple, conserve une activité trés importante 48 heures après l'injection).

L'examen de la courbe d'élimination urinaire montre que 24 heures après l'injection IP, on retrouve 60 % d'activité dans les urines. A partir de ce temps on observe un plateau d'élimination de la CMC.^{35}S ou de ses métabolites. Enfin, on remarque qu'au fur et à mesure que le plasma est épuré en CMC.^{35}S, les urines s'enrichissent en ^{35}S. Il y a donc une bonne corrélation entre les 2 résultats.

SERIES	Dpm/ml de Sérum	% retrouvé *	Dpm.totaux dans l'urine	% retrouvé *
15 minutes	788.000	5		
30 minutes	542.160	3,4		
1 heure	235.000	1,5	2.630.000	2,4
2 heures	161.000	0,9	15.957.950	14,4
4 heures	106.000	0,66	26.047.160	23,5
8 heures	73.920	0,46	53.747.780	48,5
24 heures	48.760	0,3	66.982.500	60,3
48 heures	29.670	0,2	66.955.900	60,3
	Transport sérique		élimination rénale	

- TRANSPORT SERIQUE ET ELIMINATION RENALE DE LA ^{35}S CARBOXYMETHYLCYSTEINE APRES INJECTION IP DE 50 µCi CHEZ LE RAT -

(* Le pourcentage retrouvé dans le sérum ou l'urine est exprimé par rapport à la quantité injectée)

TABLEAU I

- CARBOXYMETHYLCYSTEINE ^{35}S -

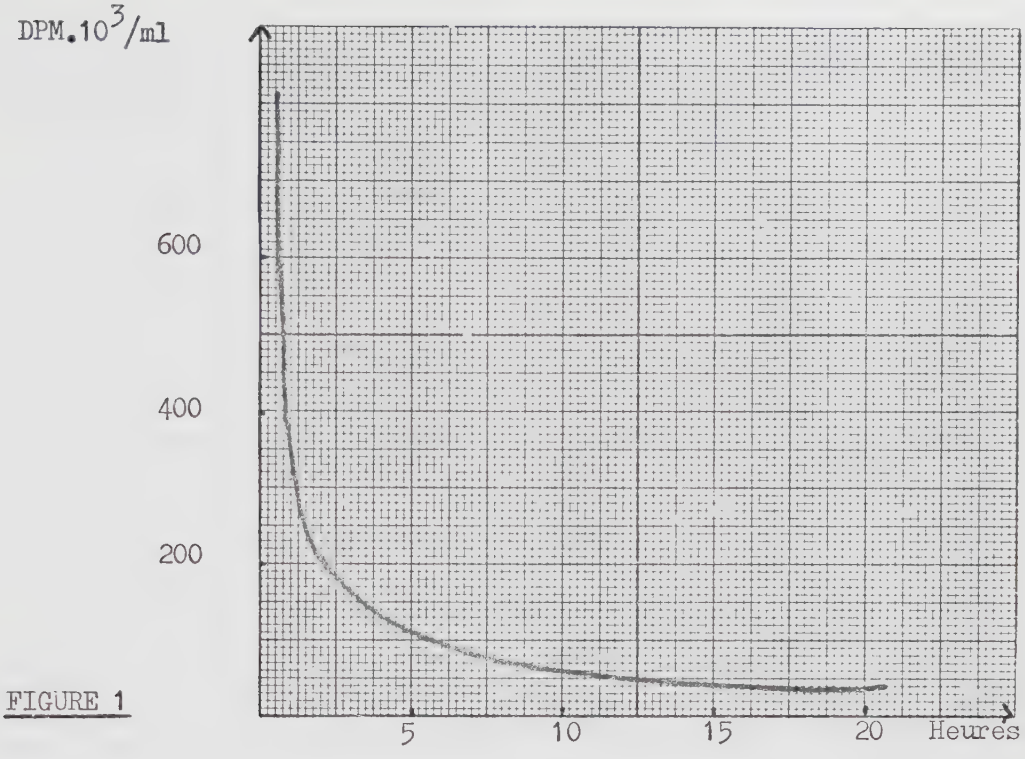


FIGURE 1

CINETIQUE DU TRANSPORT SERIQUE DE LA CMC ^{35}S OU DE SES METABOLITES APRES INJECTION IP CHEZ LE RAT DE 50 µCi

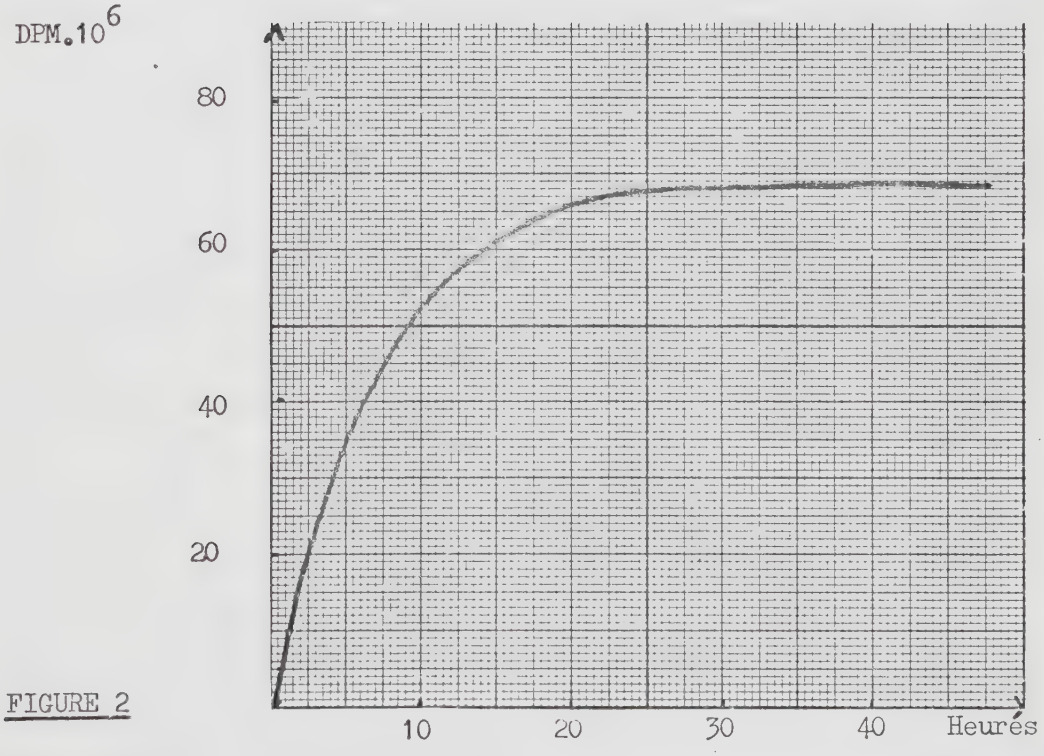


FIGURE 2

CINETIQUE DE L'ELIMINATION URINAIRE DE LA CMC ^{35}S OU DE SES METABOLITES APRES INJECTION IP CHEZ LE RAT DE 50 µCi

2) DETERMINATION DE L'ACTIVITE DANS LA PEAU TOTALE, LE DERME ET L'EPIDERME APRES INJECTION IP DE 50 µCi de CMC.^{35}S CHEZ LE RAT

Le tableau II fait état de l'activité trouvée dans la peau totale, le derme et l'épiderme des rats, à des temps variables après l'injection IP de 50 µCi de CMC.^{35}S .
On trouve dans ce tableau l'activité spécifique des tissus exprimée en dpm/mg, l'activité totale exprimée en dpm et le pourcentage d'incorporation de la ^{35}S Carboxyméthylcystéine dans chacun des tissus par rapport à l'activité injectée par voie intrapéritonéale. Les figures 3 et 4 schématisent par 2 courbes l'ensemble de ces résultats.

Si l'on considère l'activité totale retrouvée au niveau de l'épiderme et du derme, on remarque que c'est le derme qui incorpore le plus de produit soufré. Ceci est parfaitement naturel puisqu'en poids le derme représente 4 fois plus de tissu que l'épiderme.
Par contre, en activité spécifique, on note finalement que c'est l'épiderme qui, par mg de tissu, est le plus riche en CMC ou en l'un de ses métabolites. L'épiderme incorpore donc préférentiellement au derme la molécule injectée ou l'un de ses métabolites soufrés.
Le marquage plus important au niveau de l'épiderme est confirmé par autohistoradiographie de tissus cutanés de rat de la série une heure : après 2 mois de contact, on observe un marquage de la zone granuleuse et de la cornée profonde. Les gaines internes et externes ainsi que le canal du poil montrent également de nombreux grains d'argent réduits.
La glande sébacée n'apparaît pas active ; la couche de Malpighi non plus ; la CMC.^{35}S ou ses métabolites soufrés semblent donc s'incorporer uniquement au niveau des zones kératogènes.

L'épiderme retient, en outre, le produit pendant un peu plus longtemps que le derme ; ceci s'observe sur la courbe présentée à la figure 4 : l'activité totale est en effet stationnaire pendant 8 heures dans le derme puis chute brutalement.
Dans l'épiderme, l'élimination, si elle est continue, est par contre plus lente.
Nous n'expliquons pas bien la chute d'incorporation dans les tissus entre 1 heure et 2 heures. Peut-être y a-t-il 2 phases dans l'incorporation du produit au niveau cutané :

	PEAU TOTALE			DERME			EPIDERME		
	dpm/mg	dpm.10^3	%	dpm/mg	dpm.10^3	%	dpm/mg	dpm.10^3	%
15 minutes	235	3.525	3,18	198	2.376	2,14	283	850	0,77
30 minutes	268	4.020	3,62	194	2.330	2,10	286	858	0,77
1 heure	185	2.775	2,5	188	2.260	2,03	180	543	0,50
2 heures	233	3.495	3,15	158	1.895	1,71	200	600	0,54
4 heures	270	4.050	3,65	161	1.930	1,74	180	543	0,50
8 heures	136	2.040	1,84	150	1.800	1,62	100	303	0,27
24 heures	28	420	0,38	24	288	0,26	60	180	0,16
48 heures	12	180	0,16	12	145	0,13	72	216	0,19

- ACTIVITE DANS LA PEAU TOTALE, LE DERME ET L'EPIDERME APRES INJECTION IP DE 50 µCi DE ^{35}S CARBOXYMETHYLCYSTEINE CHEZ LE RAT -

TABLEAU II

(% = Pourcentages de la quantité injectée IP)

- CARBOXYMETHYLCYSTEINE ^{35}S -

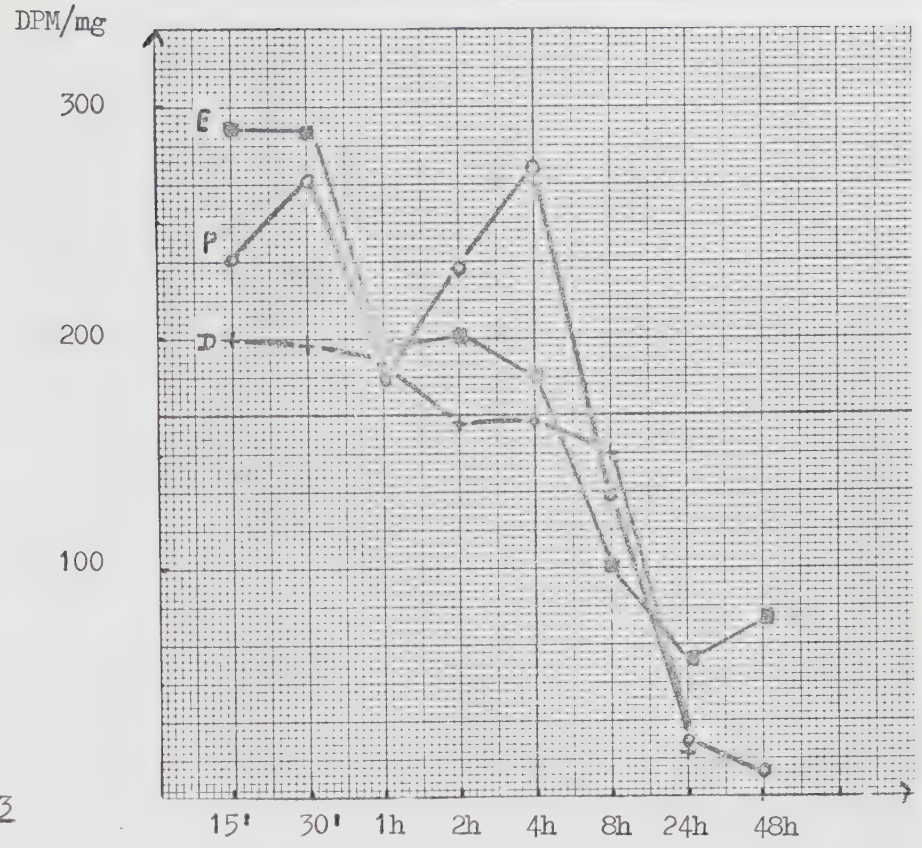


FIGURE 3

ACTIVITE SPECIFIQUE (dpm/mg) DANS LA PEAU TOTALE, L'EPIDERME ET LE DERME APRES INJECTION IP DE 50 µCi de CMC.^{35}S

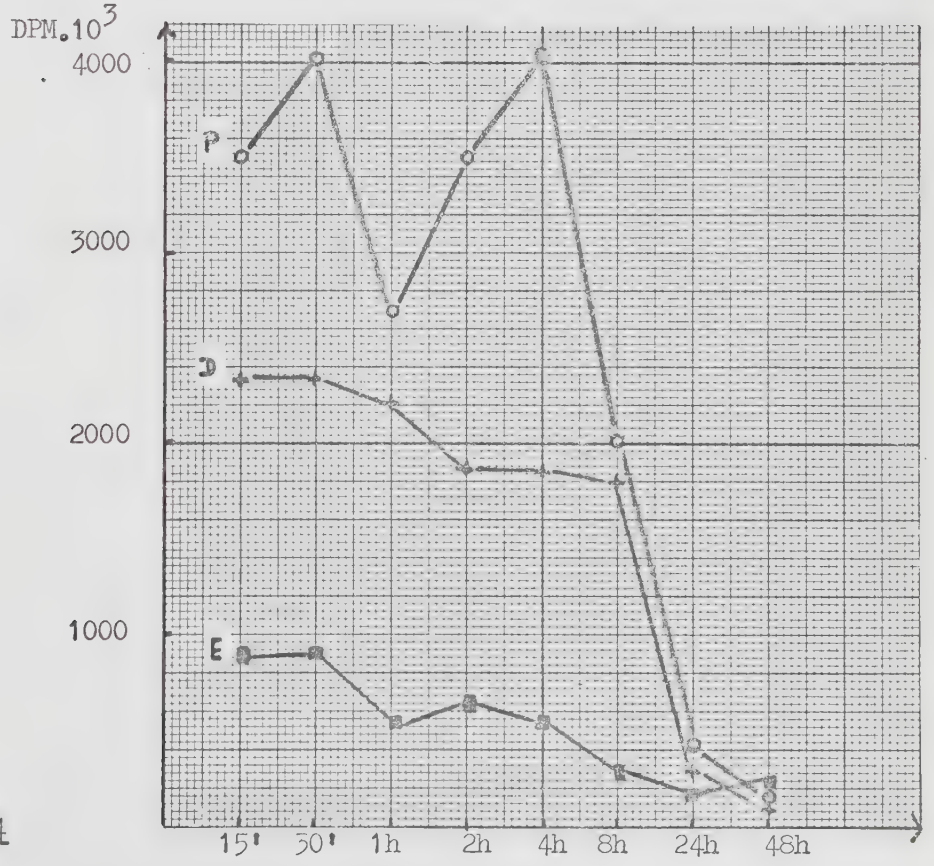


FIGURE 4

ACTIVITE TOTALE : DPM.10^3 INCORPORES DANS LA PEAU L'EPIDERME ET LE DERME APRES INJECTION IP DE 50 µCi de CMC.^{35}S

La première phase qui s'étend du temps 0 à 2 heures pourrait correspondre à une contamination par diffusion du produit dans la peau ; la seconde phase (2 à 8 heures) pourrait correspondre à l'incorporation effective de la carboxyméthylcystéine dans la peau.

En conclusion, on peut souligner que la CMC.^{35}S se fixe au niveau cutané et préférentiellement dans les zones kératogènes. L'incorporation n'est pas négligeable puisque dans les premières heures 3% du produit injecté se retrouvent dans la peau. L'élimination du produit ou de ses métabolites est relativement lente et semble effective à partir de la 8ème heure seulement.

3) DETERMINATION DE L'ACTIVITE DANS LES POILS DU RAT APRES INJECTION IP DE 50 µCi de CMC.^{35}S

La fixation de carboxyméthylcystéine ^{35}S dans les poils n'est pas négligeable ; cependant, l'élimination à ce niveau semble assez rapide. Ce résultat est assez surprenant car on pourrait penser que le produit, une fois fixé dans les poils ne serait pas éliminé : notons qu'il s'agit bien là d'une fixation dans le poil lui-même et non d'une incorporation au niveau du follicule pileux puisque l'animal a été tondu. Ce résultat suggère que le poil n'est pas un tissu totalement inerte.

Enfin, on observe au temps t = 1 heure, comme dans le cas de l'épiderme, une trés légère chute de l'incorporation qui précède d'environ une heure une même décroissance de l'activité au niveau du derme. Nous avons déjà souligné que nous n'interprétions pas trés bien ce phénomène. (Tableau III et figure 5).

4) CHROMATOGRAPHIES ET AUTORADIOGRAPHIES DES URINES DE RATS AYANT RECU IP 50 µCi de ^{35}S CARBOXYMETHYLCYSTEINE : MISE EN EVIDENCE DES METABOLITES.

La figure 6 résume l'ensemble des résultats obtenus par chromatographies et autoradiographies des urines de rats ayant reçu par voie intrapéritonéale ou par voie d'application topique 50 µCi CMC.^{35}S .

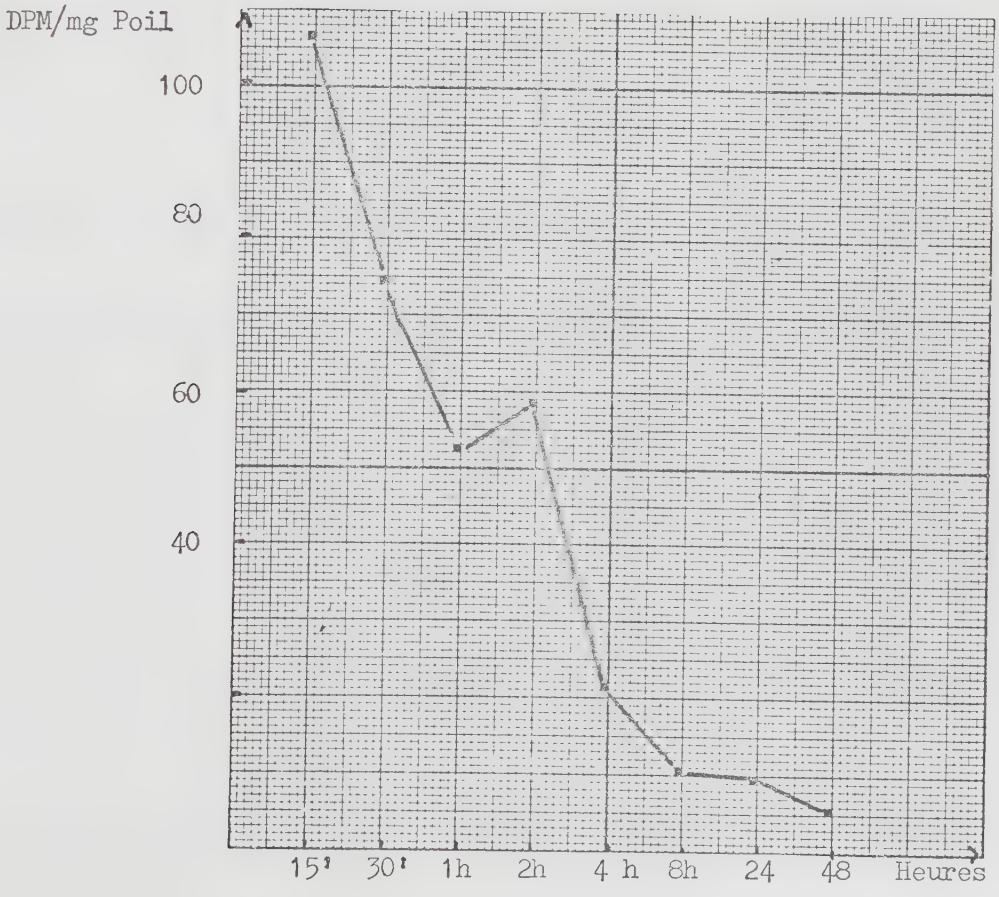
L'examen du chromatogramme montre tout d'abord que la carboxyméthylcystéine ^{35}S utilisée contient 2 principales impuretés que l'on a pu identifier à de la cystine pour la tache B de Rf 0,043 et à de la cystéine pour la tache C de Rf 0,052. Ces deux impuretés représentent 17 % de l'activité totale du produit.

TABLEAU III

- INCORPORATION DE CMC.^{35}S DANS LES POILS DU RAT APRES INJECTION IP DE 50 µCi -

	Dpm/mg	Dpm.10^3	%
15 minutes	106	212	0,19
30 minutes	75	150	0,13
1 heure	53	106	0,095
2 heures	58	116	0,104
4 heures	22	44	0,039
8 heures	10,6	21,2	0,019
24 heures	9,5	19	0,017
48 heures	5,6	11,2	0,010

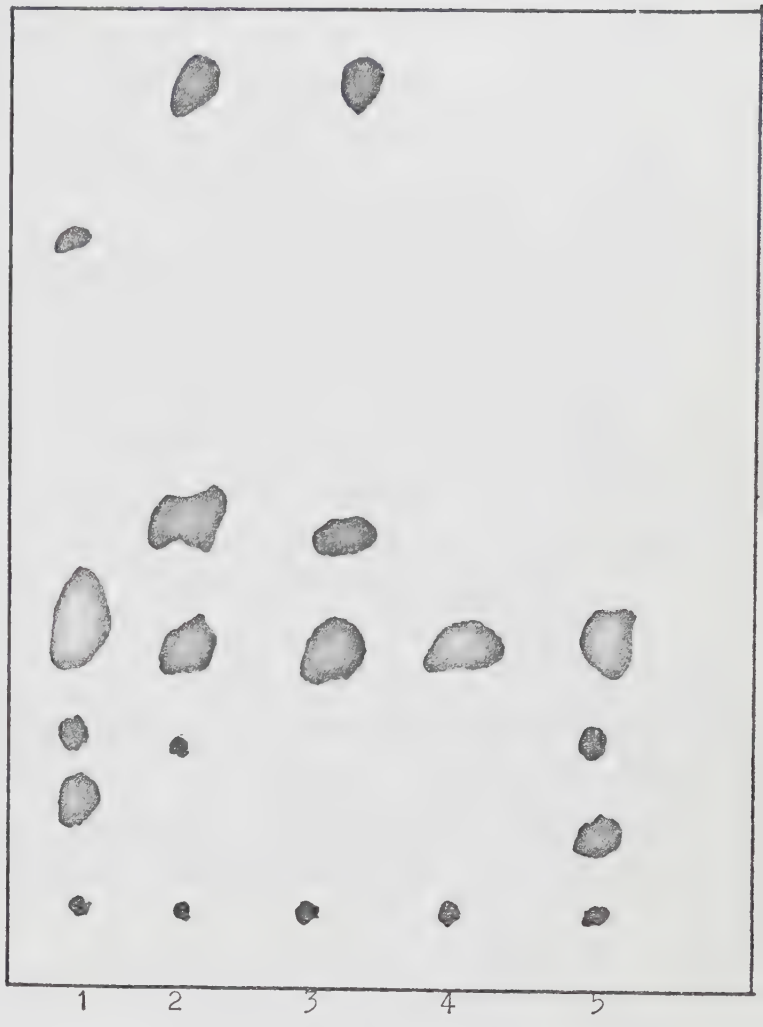
FIGURE 5



(% = Pourcentages de la quantité injectée IP)

FIGURE 6

	Rf	N	% *	% **	
G	0,77	-		27	?
F	0,63	+			CMC (Lact)
E	0,21	-		27,5	?
D	0,17	+	83	41	CMC
C	0,052	+	10,6	4,5	Cysté
B	0,043	+	6,7		Cysti
A					Dép.



AUTORADIOGRAPHIES DE LA ^{35}S CARBOXYMETHYLCYSTEINE DANS LES CONDITIONS SUIVANTES :

- 1 Carboxyméthylcystéine ^{35}S (produit de référence)
- 2 Urine de rats ayant reçu IP 50 µCi de CMC.^{35}S
- 3 Urine de rats ayant reçu par application 50 µCi de CMC.^{35}S
- 4 Surnageant d'un broyat d'épiderme des rats de la série 30 minutes
- 5 Milieu d'incubation de l'expérience in vitro

- * % dans le produit de référence
- ** % dans les urines des rats injectés IP
- N + ou - à la ninhydrine
- Lact = forme Lactame

Les urines de rats ne contiennent plus de cystine et la proportion de cystéine dans ces urines n'est plus que de 4,5 % alors qu'elle était de l'ordre de 10 % dans le produit de référence. La présence de cystéine et de cystine dans le produit administré masque certainement le taux réel d'incorporation de CMC dans la peau car la cystéine. ^{35}S injectée IP montre seule, une fixation assez spécifique au niveau cutané. Cependant, cette seule impureté dans le produit de référence ne suffit pas à expliquer l'importance de la radioactivité trouvée dans la peau.

La carboxyméthylcystéine migre dans le système BAE avec un Rf de 0,17 (ligne D). Dans les urines, on retrouve 41 % de la CMC. ^{35}S non métabolisée. Les deux métabolites soufrés principaux migrent avec des Rf respectifs de 0,21 et 0,77 ; ils apparaissent au même moment dans les urines et les proportions de chacun d'eux restent identiques tout au long de l'expérience (27,5 % et 27 %). Nous n'avons pas pu identifier ces métabolites, par contre, certaines fonctions ou atomes ont été mis en évidence : ces métabolites sont soufrés et non révélables à la ninhydrine ce qui exclut une fonction aminée. On peut donc penser que la molécule est coupée par l'organisme entre le soufre et la fonction amine. Cette observation est en accord avec les résultats des différents travaux présentés au Congrès de la Chimie des dérivés du soufre à VENISE en 1970 (93).

5) EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES

5-1- Chromatographie et autoradiographie du surnageant d'un broyat d'épiderme des rats de la série 30 minutes

Aprés avoir broyé dans 5 ml de sérum physiologique le pool des épidermes des rats de la série 30 minutes (rats IP), puis centrifugé ce broyat, on réalise dans le système BAE une chromatographie du surnageant ; enfin le chromatogramme est autoradiographié. Après 3 mois de contact, seule la carboxyméthylcystéine apparaît sous la forme d'un spot. (Figure 6)

Cette seule expérience ne permet pas de conclure que la CMC n'a pas été métabolisée au niveau cutané car la quantité incluse sur le chromatogramme était faible et certains métabolites ont pu ne pas être décelés. D'autre part, l'activité se trouve liée dans les zones kératogènes (fractions insolubles) et certains métabolites ont pu ne pas être entraînés dans la phase aqueuse qui constitue le milieu d'extraction.

5-2 Cinétique de la CMC.^{35}S après administration par voie topique

Le protocole expérimental a été exposé à la page 87.
Précisons pour compléter que les rats ont été sacrifiés aux temps 1 h, 2 h, 4 h, 6 h et 7 h. après application de 50 µCi de CMC.^{35}S sur une aire dorsale cutanée de 5 x 5 cm.
L'autoradiographie du chromatogramme des urines (Figure 6) montre que les Rf des différents métabolites ont la même valeur que dans les expériences où le produit a été administré IP. Le produit franchit donc la barrière cutanée assez rapidement puisque dès la première heure ses métabolites sont décelables dans les urines.
L'autohistoradiographie permet de déceler une certaine activité dans les gaines internes et externes du poil et du follicule. L'incorporation est plus importante dans la granuleuse et la cornée. On ne révèle aucune activité dans les glandes sébacées ; le derme ne présente aucun marquage.
Ces observations sont à rapprocher de celles effectuées dans le cas où la CMC.^{35}S était injectée par voie intrapéritonéale.

5-3 Incubation de 50 µCi de CMC.^{35}S avec 16 cm2 de peau de rats

Dans 6 ml de tampon K.R.P. pH 7,3 (voir composition page 10), contenant 50 µCi de CMC.^{35}S, on incube pendant 4 heures à 37°C 16 cm2 de peau de rats découpée en fins morceaux. On broye au mortier avec du sable de Fontainebleau les peaux incubées en présence de leur "jus d'incubation".
Après centrifugation, on chromatographie et autoradiographie le surnageant. On ne décèle pas sur l'autoradiogramme la présence des métabolites de la carboxyméthylcystéine (figure 6).
Dans une telle expérience, il n'est pas possible d'affirmer que la peau ne métabolise pas la molécule soufrée car "in vitro" la quantité de produit transformé peut être quantitativement trés faible et non décelable.

6) CONCLUSION

Une telle étude de la ^{35}S.Carboxyméthylcystéine permet de tirer les conclusions suivantes :

La CMC.^{35}S est une molécule qui se localise au niveau cutané préférentiellement au niveau de l'épiderme dans les zones kératogènes.

On relève également une incorporation durable au niveau du thymus (plus de 24 heures). Ce fait assez rare mérite d'être signalé . La molécule et ses métabolites sont éliminés relativement lentement de l'organisme (60 % par la voie rénale). Si nous n'avons pu déterminer la nature exacte des 2 métabolites principaux de la CMC dans les urines, nous avons, cependant, précisé que ceux-ci sont soufrés mais non aminés ce qui permet de penser que la molécule de référence est scindée biologiquement entre l'atome de soufre et la fonction amine.
Ce résultat est en accord avec ceux de la littérature (93). La molécule n'est cependant pas entièrement métabolisée, on retrouve encore 41 % de la CMC intacte dans les urines.

Chapitre IV

DISTRIBUTION ET DEVENIR METABOLIQUE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE ^{35}S (BTE ^{35}S) CHEZ LE RAT

1) TRANSPORT SERIQUE ET ELIMINATION RENALE DU BTE.^{35}S

Les résultats consignés dans le tableau IV et les figures 7 et 8 rapportent et illustrent les mesures de l'activité trouvée, d'une part dans le sérum sanguin et d'autre part dans les urines après injection intrapéritonéale de 12,3 µCi de Chlorhydrate de BTE.^{35}S et sacrifice des animaux 1 heure, 2 heures, 4, 7, 16, 24 et 48 heures après injection.

Le transport du Chlorhydrate de BTE ou de ses métabolites soufrés dans le sang décroit de manière asymptotique en fonction du temps. Au bout de 1 heure on retrouve 4% de l'activité injectée au niveau du sérum sanguin ; ce pourcentage n'était que de 1,5 % au temps une heure dans le cas de la carboxyméthylcystéine ^{35}S. D'une manière générale, si l'on compare le transport sérique de la CMC.^{35}S et du BTE.^{35}S ou de leurs métabolites soufrés, on remarque que les dérivés cystéaminiques sont moins rapidement épurés au niveau sanguin que les dérivés de la carboxyméthylcystéine. Cependant, le fait que la décroissance d'activité du BTE dans le sang se traduise en fonction du temps par une courbe d'allure asymptotique ne s'amortissant pas en plusieurs ondes, suggère que le produit ou ses métabolites soufrés ne sont pas réabsorbés au niveau tubulaire rénal.

L'examen de la courbe d'élimination urinaire (figure 8) montre qu'au temps 24 heures on retrouve 50 % de l'activité dans les urines. Au bout de ce temps, le plateau d'élimination du produit ou de ses dérivés soufrés n'est pas encore atteint puisque l'on retrouve 70 % d'activité dans les urines de 48 heures.

S E R I E S	DPM/ml de Sérum	% retrouvé*	DPM totaux dans l'urine	% retrouvé*
1 heure	1.016.000	3,8	666.500	2,44
2 heures	705.600	2,6	2.239.440	8,2
4 heures	382.200	1,4	3.305.840	12,1
7 heures	292.400	1,	8.024.660	29,4
16 heures	201.600	0,7	11.943.680	43,7
24 heures	218.400	0,8	13.447.300	49,25
48 heures	33.600	0,1	19.088.560	70;
	(transport sérique)		(élimination rénale)	

- TRANSPORT SERIQUE ET ELIMINATION RENALE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO 2 ETHYLAMINE ^{35}S APRES INJECTION IP CHEZ LE RAT de 12,3 µCi -

(*Le pourcentage retrouvé dans le sérum ou l'urine est exprimé par rapport à la quantité injectée)

TABLEAU IV

- BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE.^{35}S -

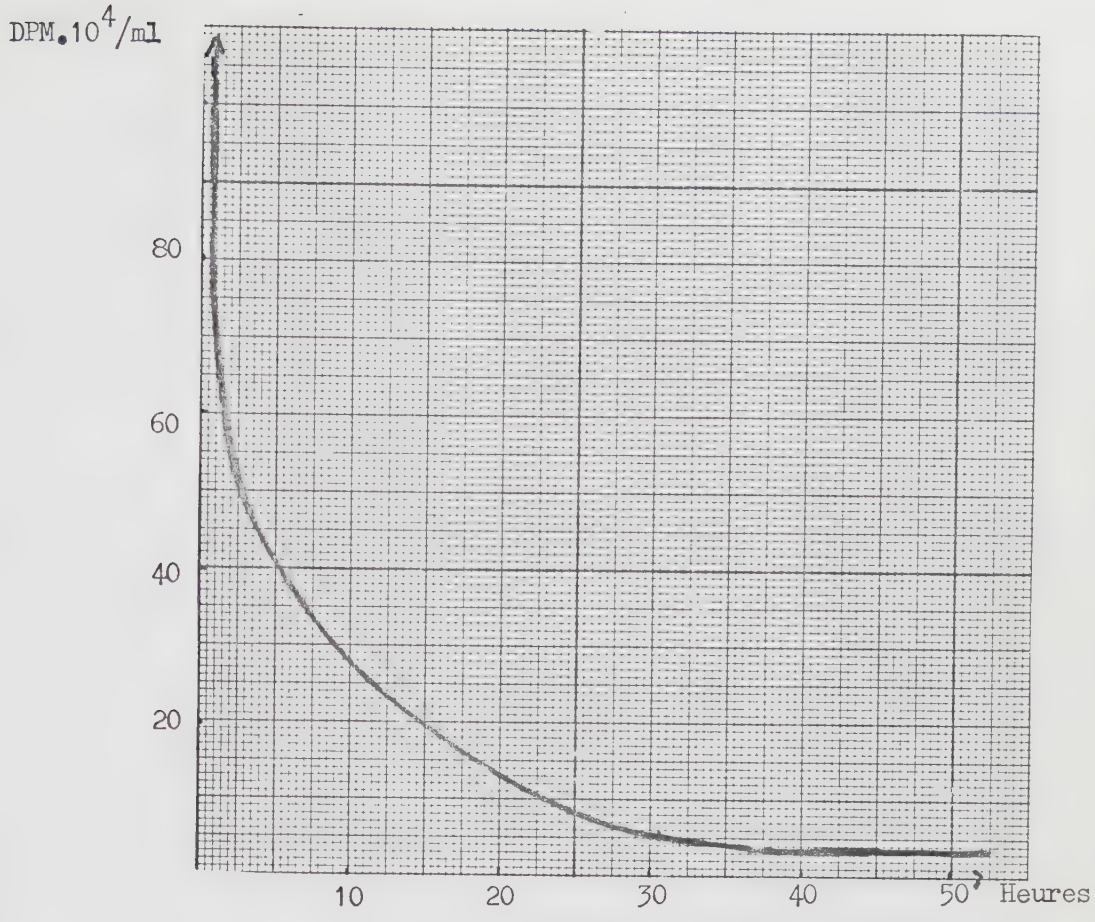


FIGURE 7 CINETIQUE DU TRANSPORT SERIQUE DES METABOLITES DU BTE.^{35}S APRES INJECTION IP DE 12,3 µCi CHEZ LE RAT

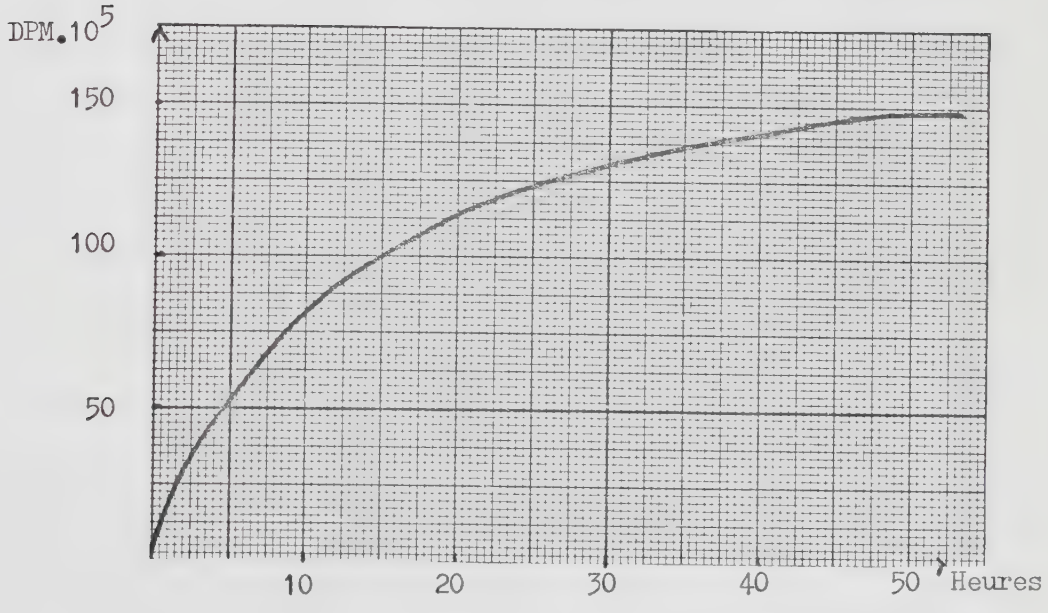


FIGURE 8 CINETIQUE DE L'ELIMINATION URINAIRE DES METABOLITES DU BTE.^{35}S APRES INJECTION IP DE 12,3 µCi CHEZ LE RAT

L'élimination du BTE et de ses métabolites contenant les atomes de soufre est donc relativement plus lente que l'élimination de la carboxyméthylcystéine et ses dérivés.
Enfin, comme dans le cas de la CMC, on remarque qu'au fur et à mesure que le plasma est épuré en BTE, les urines s'enrichissent en composés ^{35}S. Il y a ici encore une bonne corrélation entre les résultats des mesures sériques et le résultat des mesures effectuées à partir des urines.

2) DETERMINATION DE L'ACTIVITE AU NIVEAU DE LA PEAU TOTALE, DU DERME ET DE L'EPIDERME APRES INJECTION IP DE 12,3 OU 78 µCi DE CHLORHYDRATE DE BTE ^{35}S CHEZ LE RAT

Le tableau V fait état de l'activité trouvée dans la peau totale, le derme et l'épiderme des rats : 1 heure, 2 heures, 4, 7, 16, 24 et 48 heures après injection IP de 12,3 µCi de ^{35}S. BTE. On trouve dans ce tableau, exprimée en dpm/mg, l'activité spécifique des tissus, en dpm.10^3 l'activité totale et enfin le pourcentage d'incorporation du chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine ou de ses métabolites soufrés dans chacun des tissus par rapport à l'activité injectée IP.
Les figures 9 et 10 schématisent par 2 courbes l'ensemble de ces résultats.

Il apparait que la peau fixe trés peu le produit étudié ou tout du moins ses métabolites soufrés : on constate, en effet, entre 1 heure et 2 heures une chute d'activité trés importante ; puis, le produit ou ses métabolites contenant l'atome de soufre disparaissent un peu plus lentement de la peau ; 24 heures après l'injection on ne décèle plus d'activité au niveau cutané. Derme et épiderme retiennent de plus aussi faiblement l'un que l'autre le produit ou ses métabolites contenant l'atome du soufre.

Ainsi, le comportement de la peau vis-à-vis de dérivés cystéaminiques ou cystéiniques peut être fondamentalement différent puisque dans le cas de la ^{35}S. carboxyméthylcystéine on notait une incorporation loin d'être négligeable : on retrouve, en effet, au niveau cutané 3,6 % de l'activité totale injectée 4 heures après administration IP de CMC. ^{35}S, ce pourcentage n'est que de 0,15 % 4 heures après injection de BTE. ^{35}S. L'élimination des dérivés soufrés du BTE au niveau du derme et de l'épiderme est trés rapide et après la première heure on constate une chute importante de l'activité ; dans le cas de la carboxyméthylcystéine, au contraire, nous avons vu que l'activité se maintenait au moins 8 heures.

SERIE	PEAU TOTALE			DERME			EPIDERME		
	Dpm/mg	Dpm.10^3	%	Dpm/mg	Dpm.10^3	%	Dpm/mg	Dpm.10^3	%
1 heure	17	253,8	0,93	14,4	172,8	0,63	13,5	40,7	0,15
2 heures	5,1	76,5	0,28	4,92	59	0,21	5,04	15,1	0,05
4 heures	2,7	40,5	0,15	2,22	26,6	0,09	2,7	8,1	0,03
7 heures	3,25	48,6	0,17	1,44	17,3	0,06	1,44	4,3	0,015
16 heures	1,7	25,2	0,09	0,78	9,4	0,03	0,72	2,16	0,008
24 heures	indéterminable			indéterminable			indéterminable		
48 heures	indéterminable			indéterminable			indéterminable		

- ACTIVITE DANS LA PEAU TOTALE, LE DERME ET L'EPIDERME DU RAT APRES INJECTION IP de 12,3 µ Ci DE CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO 2 ETHYLAMINE 35 S -

(% = Pourcentages de la quantité injectée IP)

TABLEAU V

- BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE ^{35}S -

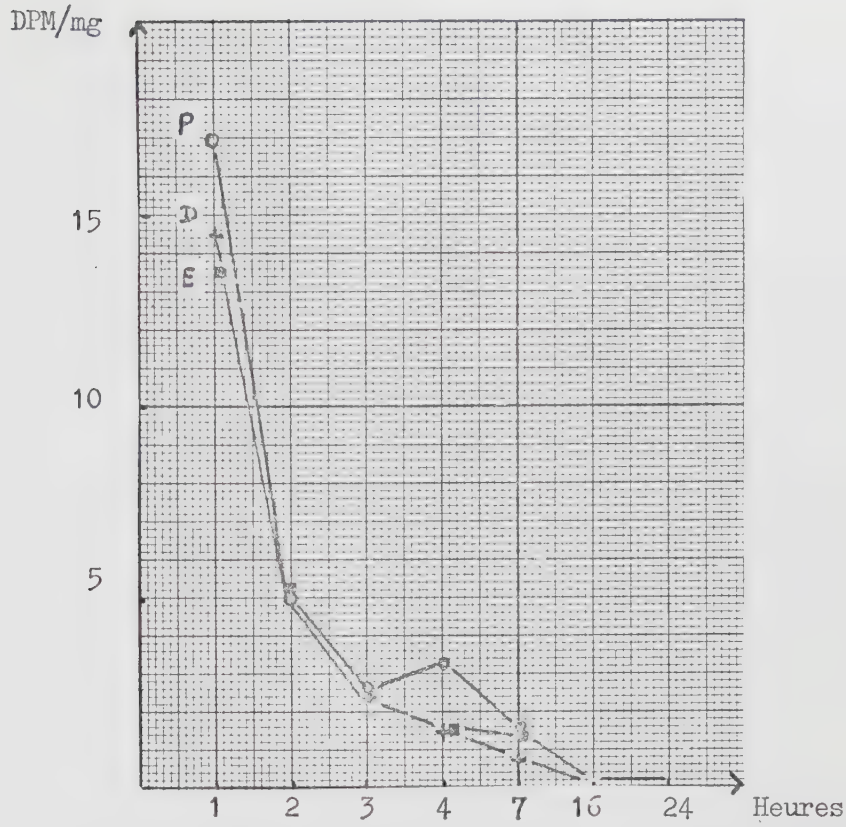


FIGURE 9

ACTIVITE SPECIFIQUE (dpm/mg) DANS LA PEAU, LE DERME ET L'EPIDERME APRES INJECTION IP DE 12,3 µCi DE BTE. ^{35}S CHEZ LE RAT

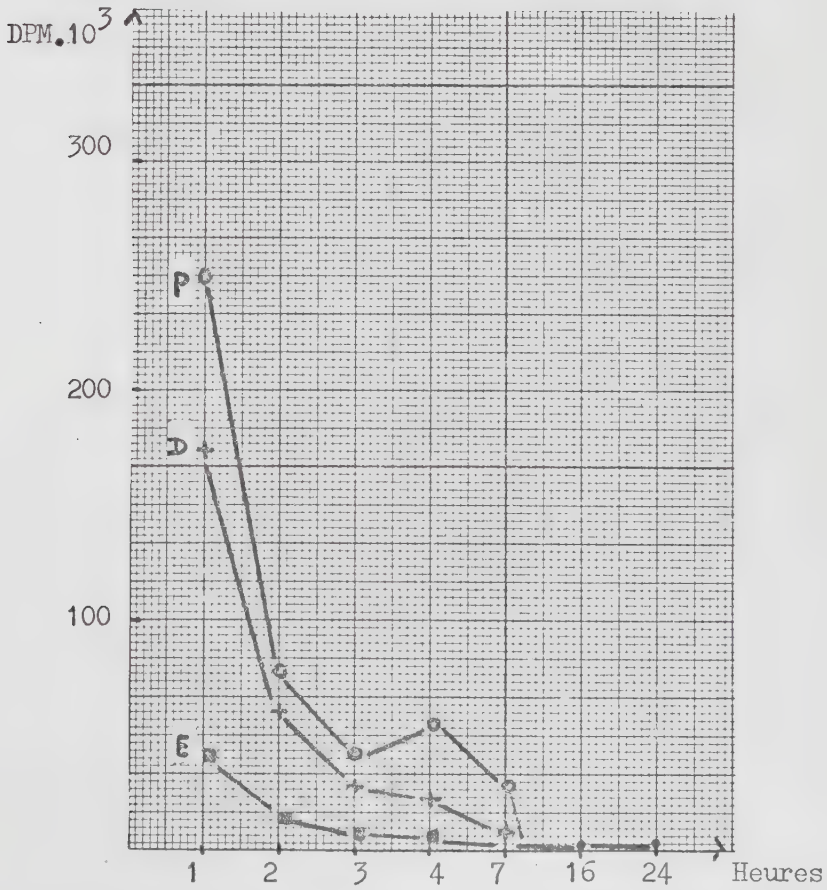


FIGURE 10

ACTIVITE TOTALE (DPM.10^3) DANS LA PEAU, LE DERME ET L'EPIDERME APRES INJECTION IP DE 12,3 µCi DE BTE. ^{35}S CHEZ LE RAT

Enfin, si on a pu mettre en évidence une affinité particulière de l'épiderme pour la CMC ou ses métabolites soufrés, dans le cas du BTE ceci n'apparait plus.

Dans une expérience complémentaire, nous avons injecté 78 µCi de Chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine à une série de 3 rats que nous avons sacrifiés 1 heure après l'injection IP. Si l'on compare l'activité trouvée au niveau des tissus cutanés dans chacune des expériences : injection de 12,3 µCi ou injection de 78 µCi de BTE ^{35}S, on remarque que le pourcentage d'incorporation est voisin dans chacun des tissus quelle que soit la dose injectée (Tableaux V et VI). Le faible taux d'incorporation du BTE ^{35}S ou de ses métabolites soufrés au niveau cutané dans le premier essai n'est donc pas imputable à la faible quantité injectée dans cette première série d'expériences.

3) CHROMATOGRAPHIES ET AUTORADIOGRAPHIES DES URINES DE RATS AYANT RECU IP 12,3 µCi de CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE ^{35}S : MISE EN EVIDENCE DES METABOLITES

L'étude des chromatogrammes et autoradiogrammes représentés à la figure 11 permet de constater que dans l'urine ou dans l'eau, le chlorhydrate de BTE migre avec un Rf de 0,50. Le produit de référence contient quelques impuretés que l'on a pu identifier à de la cystamine pour la tache B de Rf 0,05 ; à de la cystéamine pour la tache D de Rf 0,20 et à du benzylmercaptan pour la tache K de Rf 0,90; les impuretés C et E n'ont pu être identifiées. Chacune de ces taches représente environ 1% de l'activité du chromatogramme ; l'ensemble de ces impuretés a été calculé à 5 %.

Si l'on considère l'autoradiochromatogramme, on remarque tout de suite que la benzyl thio-2-éthylamine a été entièrement métabolisée dans l'organisme et que c'est au moins sous la forme de deux métabolites soufrés (F et I) qu'elle a été excrétée. Nous avons vu précédemment qu'injectée dans les mêmes conditions, la carboxyméthylcystéine ^{35}S n'était pas entièrement métabolisée par l'organisme puisque 41 % de la molécule de référence était retrouvée intacte dans les urines. On constate donc ici, une fois encore, que l'organisme peut avoir un comportement bien différent vis-à-vis de dérivés cystéiniques et cystéaminiques.

La tache F de Rf 0,38 correspond donc à un des métabolites soufrés du BTE. Ce dernier représente 11,7 % de l'activité déposée en haut du chromatogramme.

	Dpm/mg	Dpm – Totaux	% Act.injectée
. PEAU	96	1.440.000	0,83
. DERME	99	1.188.000	0,68
. EPIDERME	79,4	238.200	0,14

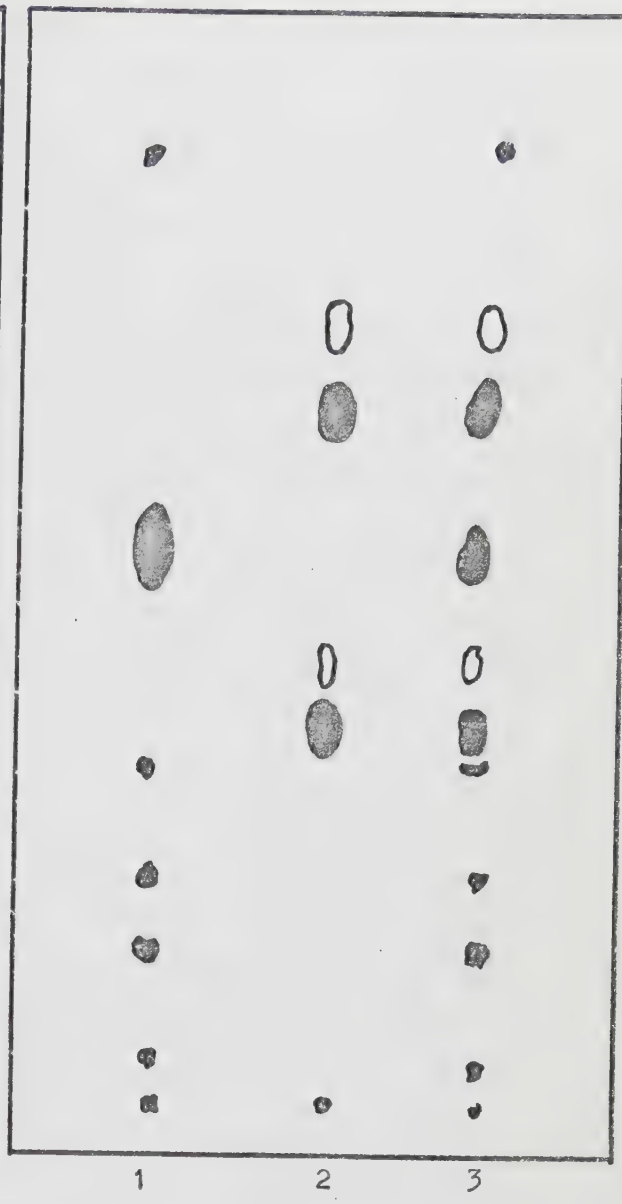
– DETERMINATION DE L'ACTIVITE AU NIVEAU DE LA PEAU TOTALE, DU DERME ET DE L'EPIDERME APRES INJECTION INTRAPERITONEALE DE 78 µCi du CHLORHYDRATE DE BTE ^{35}S AU BOUT DE 1 HEURE –

TABLEAU VI

- BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE ^{35}S -

FIGURE 11

	Rf	N	UV	%	
K	0,9	-	+		bz.mp
J	0,72	+	-		
I	0,65	-	+	83	?
H	0,5	+	+	0	BTE
G	0,42	+	-		
F	0,38	+	-	11,7	?
E	0,34				
D	0,20				cystéa
C	0,16				
B	0,05				cysta
A					dép



AUTORADIOGRAPHIES DU CHLORHYDRATE DE ^{35}S BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE DANS LES CONDITIONS SUIVANTES :

- 1 BTE.^{35}S en solution dans l'eau
- 2 Urines de rat ayant reçu IP 12,3 µCi de 1
- 3 BTE.^{35}S ajouté aux urines 2

- UV; N positif ou négatif à la ninhydrine ou à l'observation en UV.
- ● Taches radioactives (donc soufrées)
- O Taches non visibles sur l'autoradiogramme mais décelables sur le chromatogramme.

Ce métabolite se révèle positif à la ninhydrine (fonction amine). Ce métabolite est également positif à la coloration par la diméthylamino-benzaldéhyde qui révèle les arylamines ; positif à la réaction de diazotation et de couplage avec la N naphthyléthylènediamine qui caractérise les arylamines. La réaction au glucose-acide phosphorique qui met en évidence les amines aromatiques est également positive. Les révélations au réactif diéthylamine-sulfate de cuivre pour identification des thio-acides et au nitroprussiate de sodium pour identification des sulfonamides sont négatives.

Les premiers résultats pourraient faire penser que ce métabolite correspond à une arylamine soufrée. Cependant, ce métabolite n'est pas visible en lumière ultraviolette (253 ou 266 nm). De plus, l'urée de l'urine migre avec le même Rf et se révèle paradoxalement avec les réactifs ci-dessus énumérés. Dès lors, il devient impossible dans un tel système d'identifier correctement le métabolite de Rf 0,38.

Le métabolite $\overset{\circ}{I}$ de Rf 0,65 représente 83 % de l'activité totale de l'urine. La révélation par la ninhydrine d'une fonction amine éventuelle s'est avérée négative. Ce métabolite soufré (il est actif et d'autre part, révelable à l'iodoplatinate de sodium) est de plus visible en lumière ultraviolette (noyau benzyle). Il y aurait donc vraisemblablement ici, comme dans le cas de la carboxyméthylcystéine, une coupure entre le soufre et l'amine lorsque le produit est métabolisé dans l'organisme.

Notons, enfin, que les deux métabolites apparaissent dès les premières mictions et que leurs proportions dans les urines restent identiques tout au long de l'expérience.

4) CONCLUSION

Après injection intrapéritonéale du chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine ^{35}S, on constate que les métabolites soufrés sont peu retenus au niveau cutané. Contrairement à ce qui se passe dans le cas de la CMC.^{35}S, le BTE ^{35}S est entièrement métabolisé par l'organisme ; les deux métabolites soufrés retrouvés dans les urines représentent 11,7 et 83 % de l'activité totale des urines. L'étude des chromatogrammes et autoradiogrammes de ces urines suggère que le produit initial est coupé au niveau du soufre du côté de la fonction amine. Ceci doit être confirmé par l'étude suivante où l'on injectera dans les mêmes conditions le même dérivé, mais cette fois marqué au ^{14}C en positions 1 et 2 entre la fonction amine et l'atome de soufre.

Chapitre V

DISTRIBUTION ET DEVENIR METABOLIQUE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C CHEZ LE RAT

1) TRANSPORT SERIQUE ET ELIMINATION RENALE DU BTE 1,2 ^{14}C APRES INJECTION IP DE 50 µCi

Le tableau VII ainsi que les figures 12 et 13 rapportent et illustrent les résultats des mesures de l'activité trouvée dans le sérum sanguin et dans les urines après injection intrapéritonéale de 50 µCi de chlorhydrate de BTE 1,2 ^{14}C et ce, 30 minutes, 1 heure, 2, 3, 4, 5, 6 et 20 heures après l'injection.

La cinétique de transport des métabolites radioactifs au niveau du sérum après injection de BTE 1,2 ^{14}C est très nettement différente de la cinétique de transport des métabolites contenant l'atome de soufre après injection IP de BTE ^{35}S. En effet, si 1 heure après l'injection on retrouve dans les 2 cas 3,8 % de l'activité injectée, 2 heures après, le pourcentage dans le sang est de 2,6 dans le cas d'une injection de BTE ^{35}S et de 0,7 dans le cas d'une injection de BTE 1,2 ^{14}C. Après injection de BTE ^{35}S, il faut attendre 16 heures avant de trouver 0,7 % de l'activité totale injectée dans le sang.

Cependant, dans cette expérience encore, l'activité au niveau du sérum décroit de manière asymptotique et le fait que cette décroissance d'activité se traduise en fonction du temps par une courbe asymptote ne s'amortissant pas en plusieurs ondes exclut que les métabolites soient réabsorbés au niveau tubulaire rénal.

Cette seule différence de cinétique confirme dès à présent que les métabolites ^{14}C sont différents de ceux contenant les atomes de soufre.

S E R I E S	DPM/ml de Sérum	% retrouvé*	DPM totaux dans l'urine	% retrouvé*
30 minutes	7.495.250	6,75	1.462.160	1,32
1 heure	4.250.545	3,8	14.770.440	13,3
2 heures	712.369	0,7	25.398.000	22,9
3 heures	411.180	0,4	38.154.680	34,4
4 heures	267.680	0,25	52.306.800	47,1
5 heures	200.970	0,18	63.276.600	57
6 heures	99.726	0,09	73.026.700	65,8
20 heures	12.864	0,01	79.928.100	72
	Transport sérique		Elimination rénale	

- TRANSPORT SERIQUE ET ELIMINATION RENALE DU BTE 1,2 ^{14}C. APRES INJECTION IP de 50 µCi CHEZ LE RAT -

(*Le pourcentage retrouvé dans le sérum où l'urine est exprimé par rapport à la quantité injectée)

TABLEAU VII

- BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C -

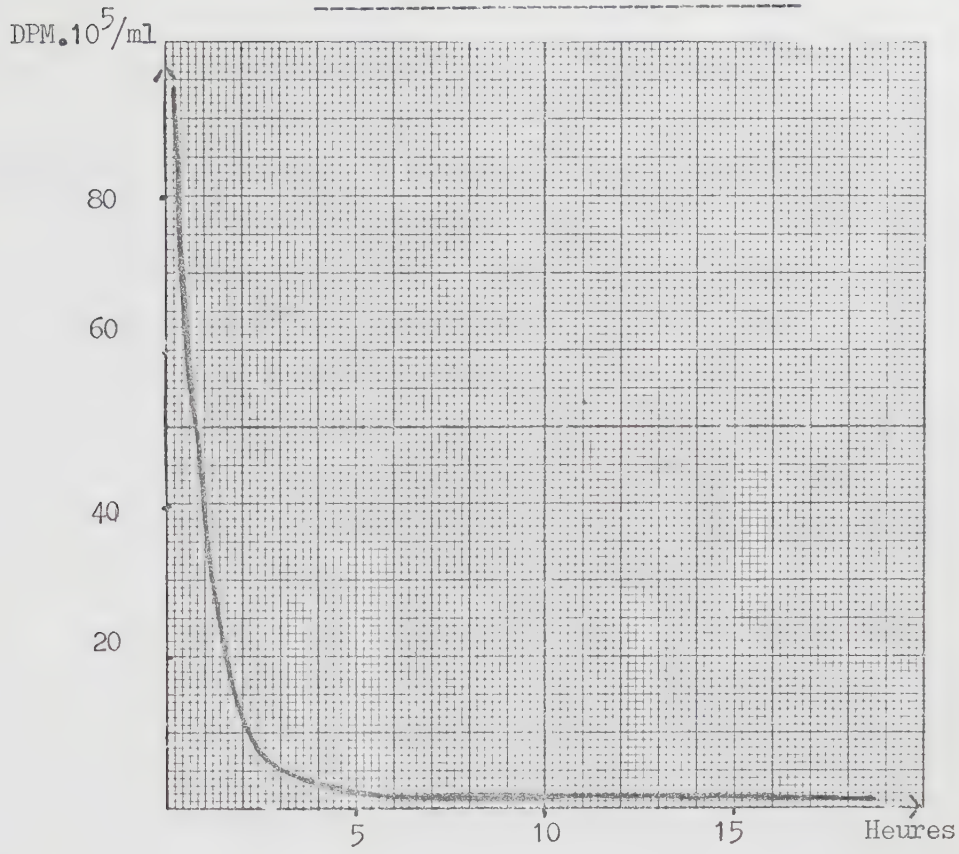


FIGURE 12

CINETIQUE DU TRANSPORT SERIQUE DE 50 µCi DE BTE 1,2 ^{14}C APRES INJECTION IP CHEZ LE RAT

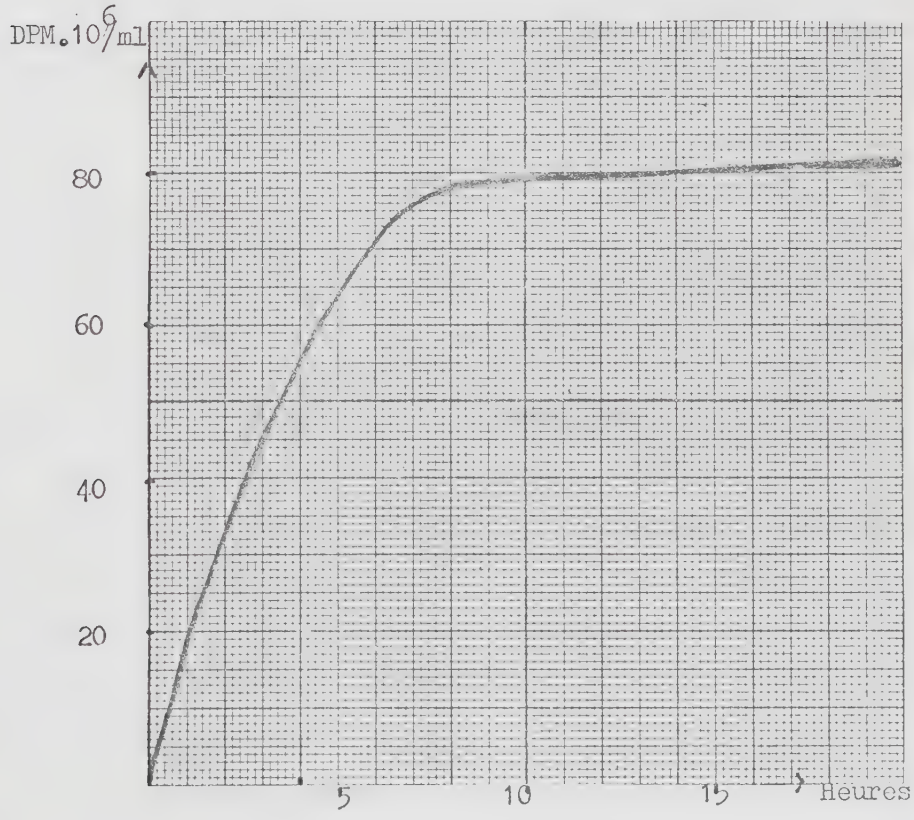


FIGURE 13

CINETIQUE DE L'ELIMINATION URINAIRE DE 50 µ Ci DE BTE 1,2 ^{14}C INJECTES IP CHEZ LE RAT

L'examen de la courbe de l'excrétion urinaire des métabolites du BTE 1,2 ^{14}C montre pendant les premières heures qui suivent l'injection une augmentation rapide et constante de l'activité jusqu'à 6-7 heures. Ensuite, on observe un palier qui semble atteint dès que l'activité représente dans l'urine 70 % de la quantité injectée (8ème heure). Si l'on compare cette cinétique avec la cinétique urinaire établie après injection de la molécule marquée au ^{35}S, on constate que les métabolites contenant les isotopes ^{14}C se retrouvent plus rapidement dans l'urine ; ces métabolites seraient-ils moins longuement retenus dans les tissus ?

Enfin, comme dans le cas de la CMC.^{35}S et du BTE ^{35}S, on peut remarquer qu'au fur et à mesure que le plasma est épuré en BTE, les urines s'enrichissent en métabolites radioactifs ; ainsi, ici encore, il y a une excellente corrélation entre les résultats des mesures sériques et le résultat des mesures effectuées à partir des urines.

2) INCORPORATION DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C DANS QUELQUES ORGANES APRES INJECTION IP DE 50 µCi

Deux rats mâles de 150 g reçoivent par voie IP 50 µCi de chlorhydrate de BTE 1,2 ^{14}C ; ils sont sacrifiés 30 minutes après l'injection. Certains organes sont prélevés puis minéralisés dans du "Soluène." L'activité de chaque tissu est ensuite déterminée.

Le tableau VIII rapporte les activités spécifiques trouvées pour les différents tissus étudiés. Il est normal de trouver une forte activité dans le foie et les reins puisque la molécule est vraisemblablement métabolisée au niveau hépatique avant d'être éliminée par les reins. Par contre, la forte activité spécifique enregistrée dans le tissu adipeux mérite notre attention dans le cadre de notre étude puisque l'on sait que ce tissu n'est pas seulement un organe de stockage des graisses, mais aussi un lieu de synthèse ; or, nous avons démontré dans les deux premières parties que le BTE inhibe la synthèse des triglycérides . Il n'est donc pas exclu que la molécule ou ses métabolites interviennent dans le métabolisme des lipides ce qui pourrait se traduire par une diminution de la synthèse des lipides neutres dans le tissu adipeux.

	DPM/mg		DPM/mg
Testicule	163	Poumon	364
Tissu adipeux épididymaire	780	Rein	936
Intestin	433	Graisses périrénales	372
Rate	415	Surrénales	543
Foie	508	Coeur	236
Thymus	286	Peau	520

- ACTIVITE TROUVEE DANS DIFFERENTS ORGANES 30 MINUTES APRES INJECTION IP DE 50 µCi de CHLORHYDRATE DE BTE 1,2 ^{14}C. -

TABLEAU VIII

3) DETERMINATION DE L'ACTIVITE AU NIVEAU DE LA PEAU TOTALE, DU DERME ET DE L'EPIDERME APRES INJECTION INTRAPERITONEALE DE 50 µCi DE CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C

Le tableau IX fait état de l'activité trouvée dans la peau totale, le derme et l'épiderme de rat 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3, 4, 5, 6 et 20 heures après injection IP de 50 µCi de chlorhydrate de BTE 1,2 ^{14}C. On trouve dans ce tableau exprimée en dpm/mg l'activité spécifique des tissus, en dpm 10^3 l'activité totale et enfin, le pourcentage d'incorporation dans chacun des tissus par rapport à l'activité injectée IP. Les figures 14 et 15 schématisent par 2 courbes l'ensemble de ces résultats.

La peau retient un fort pourcentage du produit injecté pendant la première heure. L'activité dans les deux tissus (derme et épiderme) chute ensuite d'une manière trés importante entre 1 heure et 2 heures ; puis, il y a un lent plateau d'élimination de la molécule qui doit correspondre à l'incorporation réelle du produit dans les tissus, alors qu'avant 1 heure on enregistre dans la peau plutôt une contamination par diffusion qu'une incorporation réelle.

Si on considère l'activité totale retrouvée au niveau du derme et de l'épiderme, on remarque, comme après injection de BTE ^{35}S, que c'est le derme qui incorpore le plus de produit soufré. Nous avons déjà souligné que ceci était parfaitement normal puisqu'en poids le derme représente 4 fois plus de tissu que l'épiderme. Par contre, si pendant les 2 premières heures le derme et l'épiderme incorporent par mg la même quantité du produit injecté, pendant le plateau qui correspond à la phase d'incorporation réelle dans la peau, on note une localisation préférentielle du BTE ou de ses métabolites ^{14}C dans l'épiderme.
Cette incorporation non négligeable au niveau cutané et préférentiellement dans l'épiderme est confirmée par l'autohistoradiographie de tissus cutanés de rats sacrifiés, 4 heures et même 20 heures après injection IP de 50 µCi de 1,2 ^{14}C BTE. Après 2 mois de contact, on observe un marquage trés important de la zone granuleuse et de la cornée. Les gaines du poil ainsi que le canal pilo-sébacé se révèlent également actifs. Enfin, au niveau des assises de la glande sébacée, on observe une densité de grains d'argent réduits plus importante encore que celle observable dans la couche granuleuse.

	PEAU TOTALE			DERME			EPIDERME		
	DPM/mg	DPM 10^3	%	DPM/mg	DPM 10^3	%	DPM/mg	DPM 10^3	%
30 minutes	520	7800	7,03	469	5268	5,1	500	1500	1,35
1 heure	330	4950	4,46	397	4764	4,3	380	1140	1,02
2 heures	70	1050	0,95	88	1056	0,95	90	270	0,24
3 heures	54	810	0,73	56	672	0,60	87	261	0,23
4 heures	91	1365	1,23	86	1032	0,93	120	360	0,32
5 heures	46	690	0,62	63	756	0,68	95	285	0,25
6 heures	41	615	0,55	52	624	0,56	65	195	0,18
20 heures	16	240	0,22	16	192	0,17	40	120	0,10

- ACTIVITE DANS LA PEAU TOTALE, LE DERME ET L'EPIDERME APRES INJECTION IP de 50 µCi de CHLORHYDRATE DE BTE 1,2^{14} C CHEZ LE RAT -

(% = Pourcentages de la quantité injectée IP)

TABLEAU IX

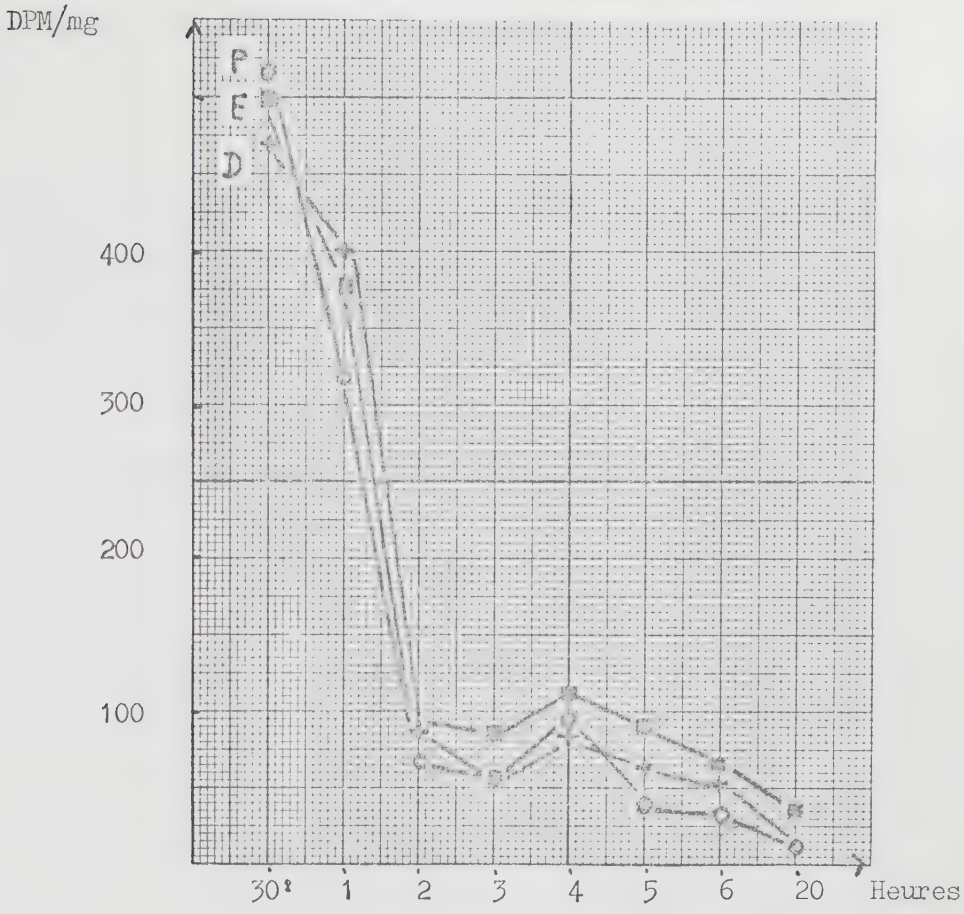


FIGURE 14

ACTIVITE SPECIFIQUE (dpm/mg) DANS LA PEAU, LE DERME ET L'EPIDERME APRES INJECTION DE 50 µCi DE BTE 1,2 ^{14}C

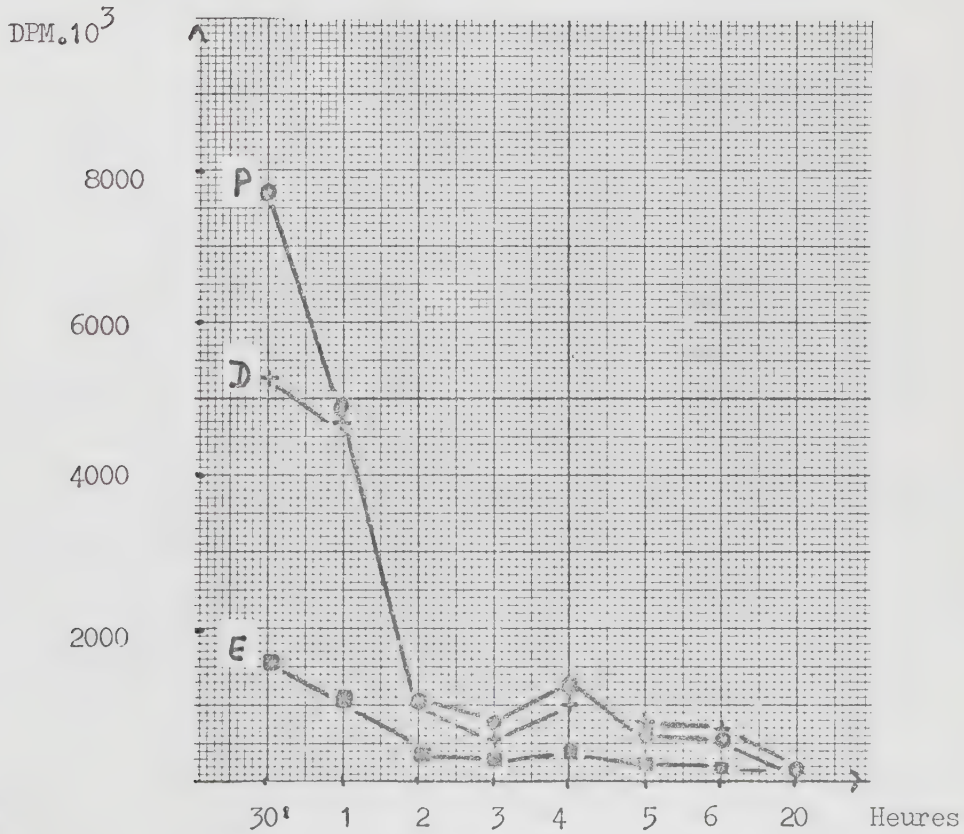


FIGURE 15

ACTIVITE TOTALE (DPM.10^3) DANS LA PEAU; LE DERME ET L'EPIDERME APRES INJECTION DE 50 µCi DE BTE 1,2 ^{14}C

Au cours de l'étude du renouvellement de la carboxyméthylcystéine ^{35}S, nous avions trouvé une incorporation non négligeable dans la peau avec également une légère localisation préférentielle dans l'épiderme. Le chlorhydrate de BTE ^{35}S ne montrait qu'une trés faible incorporation dans les tissus cutanés sans plateau d'incorporation durable, d'ailleurs.

Par contre, après injection de chlorhydrate de BTE marqué sur les carbones 1 et 2 placés entre l'atome de soufre et l'amine, on retrouve dans la peau 4,5 % de l'activité totale injectée au bout de une heure. Nous avons constaté lors d'une expérience réalisée avec cette molécule ^{35}S que le pourcentage d'incorporation au niveau cutané est constant quelle que soit la dose injectée. Compte-tenu de cette remarque, nous pouvons dire que l'on retrouve dans la peau 40 fois plus d'activité au bout de une heure en injectant IP du BTE 1,2 ^{14}C qu'en injectant du BTE ^{35}S IP chez le rat. En effet, dans le premier cas, bien que l'activité spécifique du produit de référence soit 10 fois plus faible, on retrouve dans la peau 4 fois plus de métabolites contenant les isotopes ^{14}C que de métabolites au ^{35}S. Toutes ces constations permettent de confirmer que les métabolites du BTE qui sont retenus au niveau cutané ne sont pas soufrés.

4) DETERMINATION DE L'ACTIVITE AU NIVEAU DES POILS

Le résultat des mesures de l'activité contenue dans les poils est consigné dans le tableau X.

La quantité de métabolites contenant les isotopes ^{14}C dans le poil n'est pas négligeable. Cependant, on peut penser qu'il ne s'agit pas d'une réelle incorporation car l'élimination des métabolites est régulière et continue sans formation d'un plateau qui correspondrait à une incorporation effective. Ce résultat peut surprendre car il est difficile d'imaginer que les métabolites, une fois introduits dans la matrice du poil, puissent en ressortir et on peut penser qu'il y a eu contamination du poil extérieurement. En fait, des autoradiographies ont montré que l'activité se trouve bien localisée dans la matrice et non à l'extérieur du poil ; d'autre part, ce résultat est confirmé par autohistoradiographie, comme déjà nous l'avons signalé plus haut. Ce résultat ainsi que celui obtenu à propos de l'injection de CMC.^{35}S confirme que le poil n'est pas un tissu inerte.

SERIE	DPM/mg	DPM 10^3	%
30 minutes	674	1.348	1,21
1 heure	509	1.018	0,91
2 heures	81	161	0,14
3 heures	45	90	0,08
4 heures	35	70	0,06
5 heures	25	50	0,045
6 heures	17	34	0,030
20 heures	4	8	0,007

- INCORPORATION DANS LES POILS APRES INJECTION DE 50 µCi DE BTE 1,2 ^{14}C. -

(% = Pourcentages de la quantité injectée IP)

TABLEAU X

5) CHROMATOGRAPHIES ET AUTORADIOGRAPHIES DES URINES DE RATS AYANT RECU IP 50 µCi DE CHLORHYDRATE DE BTE 1,2 ^{14}C - MISE EN EVIDENCE DES METABOLITES

L'étude des chromatogrammes et autoradiogrammes représentés sur la figure 16 montre que le chlorhydrate de BTE 1,2 ^{14}C migre avec un Rf de 0,50, ce que déjà nous connaissions par l'étude du BTE ^{35}S .
Les impuretés du produit de synthèse ne dépassent pas 8 %.
La tâche B de Rf 0,05 est une impureté du BTE qui représente - de 1% de l'activité totale du produit, cette tache correspond à de la cystamine.
La tache D de Rf 0,20 a été identifiée à de la cystéamine et est une impureté du BTE qui représente 4 % de son activité.
Le benzyl mercaptan (tache K) qui migre avec un Rf de 0,90 a pu également être décelé dans le produit de référence bien qu'il représente - de 1 % de l'activité totale du BTE.
Enfin, les impuretés C et E (3 % du produit) n'ont pu être identifiées.

Au cours de l'étude du renouvellement du BTE ^{35}S, nous avions déjà constaté que contrairement à la CMC.^{35}S, le dérivé cystéaminique était entièrement métabolisé par l'organisme, ce résultat se trouve bien évidemment confirmé par l'étude du renouvellement du BTE 1,2 ^{14}C. Le produit est excrété dans les urines sous la forme de plusieurs métabolites qui apparaissent d'ailleurs au même moment dans les mictions et dans des proportions identiques ensuite tout au long de l'expérience.

Nous reconnaissons dans les urines les métabolites F et $\overset{o}{I}$ de Rf respectifs 0,38 et 0,65 ; ils correspondent aux deux métabolites soufrés alors repérables par radiochromatographie lorsque l'on injecte du BTE ^{35}S .
Dans le cas d'une injection de BTE 1,2 ^{14}C, ils ne sont plus décelables par autoradiographie, mais repérables par leurs fonctions benzyle ou thioéther sur les chromatogrammes.

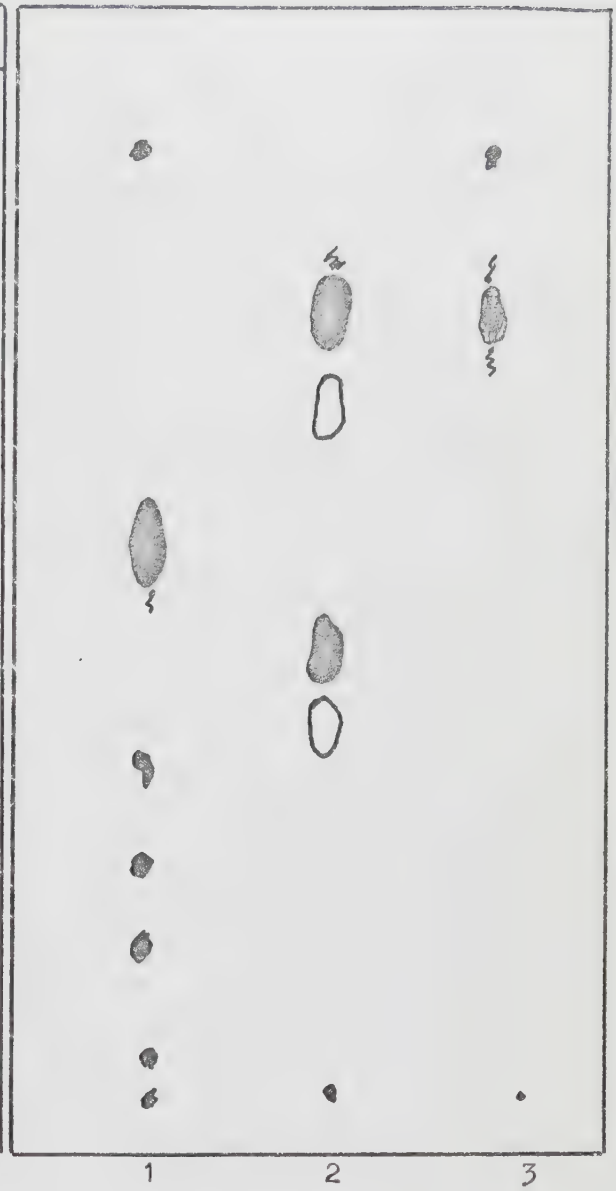
La tache G de Rf 0,42 correspond à un métabolite urinaire du BTE qui contient au moins un des carbones 14. Ce métabolite détient 19 % de l'activité des urines, il possède une fonction aminée. L'observation U.V, la révélation par l'iodoplatinate pour mettre en évidence le noyau benzyle ou la fonction thioéther se sont révélées négatives.

Le métabolite J de Rf 0,72 contient 81 % de l'activité de l'urine ; il n'est pas soufré, n'est pas repérable à la lumière ultraviolette mais, par contre, se révèle à la ninhydrine.

- BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C -

FIGURE 16

	Rf	% *	% **	N	S	UV	
K	0,9	1	1	-	+	+	Bz.mp
J	0,72		81	+	-	-	?
I	0,65			-	+	+	
H	0,50	92		+	+	+	BTE
G	0,42		19	+	-	-	?
F	0,38			+	+	-	
D	0,20	4		+	+		Cystéa.
C	0,15	2					
B A	0,05	1					Cysta. dép.



AUTORADIOGRAPHIES DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C DANS LES CONDITIONS SUIVANTES :

- 1 Chlorhydrate de BTE 1,2 ^{14}C
- 2 Urines de rat ayant reçu IP 50 µCi de 1
- 3 Broyat d'épiderme de rat ayant reçu IP 50 µCi de 1

- (N) (S) (UV) + ou - à la nihydrine, l'iodoplatinate, l'ultra-violet
- (*) (**) % activité dans le BTE (*) ou dans l'urine (**)
- ● Métabolites radioactifs
- O Métabolites non radioactifs

Ces résultats suggèrent à nouveau que la molécule est coupée entre l'amine et le soufre et d'autre part, corrobore les observations faites après injection de BTE ^{35}S. Dans ce dernier cas, le métabolite de Rf 0,65 qui est soufré, visible en UV, non révélable à la ninhydrine pourrait correspondre à la partie "Benzyl thio..."de la molécule après coupure. Le fait que ce métabolite correspond à 83 % de l'activité dans les mictions supporte notre hypothèse.

6) AUTORADIOGRAPHIE D'UN CHROMATOGRAMME D'UN BROYAT D'EPIDERME DE RAT SERIE 30 MINUTES

Après injection IP de 50 µCi de 1,2 ^{14}C BTE, nous avons broyé dans 6 ml de sérum physiologique l'épiderme dorsal d'un rat sacrifié 30 minutes après l'injection, centrifugé ce broyat, puis réalisé dans le système BAE une chromatographie suivie d'une autoradiographie du surnageant (Figure 16).

On ne retrouve plus au niveau cutané la molécule injectée mais le métabolite de Rf 0,72 repéré dans les urines ; le métabolite de Rf 0,42 n'est pas décelable sur l'autoradiogramme. Ainsi, dans l'épiderme on observe la présence d'un seul des métabolites de la molécule injectée ; ce métabolite correspond à un édifice moléculaire révélable à la ninhydrine (fonction amine), négatif à la révélation par l'iodoplatinate (il n'est pas soufré) invisible à l'observation en lumière ultraviolette (il ne contient pas le noyau benzyle).

Il n'est pas possible d'après cette expérience de préciser si ce métabolite a été formé au niveau du foie par exemple puis transporté au niveau cutané, ou si la molécule entière parvenue à la peau a été rapidement métabolisée: le radical noyau aromatique-soufre étant rapidement éliminé, l'épiderme ne conservant que la partie de la molécule contenant la fonction amine et au moins un des carbones adjacents.

Chapitre VI

CONCLUSION GENERALE

Ces études de renouvellement de dérivés soufrés marqués sur différents atomes ont apporté quelques renseignements importants que l'on peut analyser et interpéter dans leur ensemble :

Le comportement de l'organisme vis-à-vis de molécules soufrées cystéiniques et cystéaminiques est différent. La CMC n'est pas entièrement métabolisée et on la retrouve intacte à 40 % dans les mictions alors que le BTE est entièrement scindé. L'élimination par les voies urinaires est prédominante pour les deux types de molécules : elle est de l'ordre de 70 % .

Ceci ne signifie pas que la cinétique d'élimination des métabolites soit identique : en effet, les métabolites contenant le groupement éthylamine sont éliminés beaucoup plus rapidement que les métabolites soufrés ; ceci se remarque si l'on considère les cinétiques d'élimination urinaire du BTE 1,2 ^{14}C et du BTE ^{35}S. Si maintenant on compare la CMC ^{35}S et le BTE ^{35}S, on retrouve du soufre 35 dans les mictions beaucoup plus rapidement après une injection IP de CMC. Ceci peut provenir du fait que la CMC n'est pas entièrement métabolisée mais est éliminée telle quelle assez rapidement par les voies urinaires.

La plus lente élimination des métabolites soufrés par rapport à ceux qui ne le sont pas peut s'expliquer par la coupure des molécules au niveau du soufre. Le thiol ainsi libéré peut se fixer sur divers accepteurs en donnant par exemple des disulfures mixtes dont la demi-vie dans l'organisme pourrait être plus longue que la demi-vie du reste de la molécule (...-CH_2-CH_2-NH_2).

Ces remarques faites à propos de l'élimination urinaire s'appliquent à la cinétique des métabolites radioactifs au niveau sérique. On décèle, en effet, une chute d'activité dans le sérum moins rapide avec les métabolites ^{35}S qu'avec les métabolites ^{14}C.

D'autre part, on peut dire d'après les résultats des différentes études réalisées que les produits injectés sont relativement rapidement épurés du sang par les reins. Les métabolites apparaissent tous en même temps dans les urines et dans des proportions toujours identiques tout au long de l'expérience. De plus, le fait que la décroissance d'activité au niveau sérique dans chaque cas se traduise en fonction du temps par une courbe d'allure asymptotique, ne s'amortissant pas en plusieurs ondes suggère que le produit injecté ou ses dérivés ne sont pas réabsorbés au niveau tubulaire rénal pour réutilisation.

La carboxyméthylcystéine ou ses métabolites ^{35}S se retrouvent dans la peau après injection IP avec une localisation préférentielle dans l'épiderme. L'activité se maintient à un bon niveau pendant plusieurs heures après l'injection (près de 2 % de la dose injectée après 6 heures). Le résultat des mesures effectuées sur l'épiderme et le derme est corroboré par l'observation en autohistoradiographie des tissus : on décèle une fixation de la CMC ou de ses métabolites ^{35}S dans les zones kératogènes ainsi que dans la matrice du poil.

Bien que nous n'ayons pu expliquer par l'inhibition de la synthèse des lipides neutres le mode d'action des dérivés cystéiniques, l'activité non négligeable de la CMC ou de ses métabolites ^{35}S mesurée dans l'épiderme supporte les propriétés d'agents correcteurs d'un excès de sébum qui leur ont été attribuées.

Après une injection de chlorhydrate de BTE ^{35}S, nous n'avons retrouvé qu'une trés faible incorporation dans les tissus cutanés : le pourcentage d'incorporation, en effet, n'atteint pas 1 % au bout d'une heure. D'autre part, la décroissance d'activité est continue dans le temps sans apparition d'un plateau qui signifierait qu'une partie des métabolites ont été réellement incorporés.

Par contre, après injection de la même molécule marquée sur les carbones 1 et 2 placés entre l'atome de soufre et l'amine, on retrouve 40 fois plus d'activité au niveau cutané au bout d'une heure qu'après injection de BTE ^{35}S. D'autre part, nous avons vu que le métabolite retrouvé dans la peau contenait la fonction amine. Le noyau benzyle et l'atome de soufre n'y sont pas décelables. On peut donc penser que c'est la partie éthanolamine qui est retenue au niveau cutané et qui s'incorpore dans les zones kératogènes, les gaines du poil et les glandes sébacées.

Ceci n'exclut pas forcément que la molécule entière puisse se retrouver trés rapidement dans le derme ou l'épiderme, mais dans ce cas, seul un dérivé de l'éthanolamine serait incorporé ; le reste de la molécule (benzyl - soufre) étant éliminé avant la fin de la première heure après l'injection.

Il convient de rappeler à ce sujet l'importance du groupement éthylamine dont les propriétés pharmacologiques assez générales comme spasmolytique, sympathicomimétique, antihistaminique etc .... sont bien connues (83) .

Cet ensemble de constatations corrobore le résultat trouvé après incubation de la molécule dans le milieu tampon-substrat-extrait cutané employé lors de la mesure de l'activité des phosphatases acides épidermiques : après incubation nous avions fait analyser la composition du milieu qui venait d'incuber à l'aide d'un appareil Technicon*. On ne retrouvait plus que 89 % du BTE à l'analyse. Un métabolite de ce dérivé soufré correspondant à 11 % de la molécule mise à incuber était mis en évidence au niveau où l'on enregistre le pic de l'éthanolamine..... Un témoin de ce dérivé soufré qui avait incubé dans le même milieu à l'exception de la présence de l'extrait cutané ne révélait que 1 % d'éthanolamine. Nous avons déjà souligné l'importance de la fonction amine libre dans l'inhibition des phosphatases acides par de tels dérivés et le fait que l'on ne retrouve seulement qu'un métabolite sans soufre et sans radical benzyle au niveau cutané souligne le rôle important du groupement éthylamine et suggère que l'un des sites actifs de l'inhibiteur des phosphatases acides est situé au niveau de la fonction amine.

---

* Nous remercions Messieurs BORE et ARNAUD qui ont bien voulu se charger de cette analyse.

- 4ème Partie -

. RECHERCHE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C DANS LES ORGANITES SUBCELLULAIRES ISOLES DE L'EPIDERME DU RAT

Chapitre I

INTRODUCTION

Au cours des études précédentes, nous avons montré que les sels de BTE agissent sur le métabolisme des lipides en inhibant la synthèse des lipides neutres par blocage de la phosphatidate phosphatase. Après étude du renouvellement du chlorhydrate de BTE dans l'organisme et plus particulièrement dans la peau, il nous a paru intéressant d'étudier la distribution intracellulaire des métabolites de ce dérivé soufré.dans l'épiderme du rat.

Dans ce domaine d'investigation tout de travail de base était à réaliser. En effet, à notre connaissance, aucun fractionnement complet des organites subcellulaires épidermiques n'a été réalisé.

Dans un premier temps, nous nous sommes donc efforcés d'isoler et de caractériser les organites subcellulaires à partir d'un pool d'épiderme de rat, puis nous avons essayé de préciser la localisation des métabolites du BTE dans les fractions isolées.

Chapitre II

MATERIEL ET METHODES

1) FRACTIONNEMENT DES ORGANITES SUBCELLULAIRES EPIDERMIQUES DU RAT

1-1 Analyse et critique des techniques déjà existantes.

Un certain nombre d'auteurs se sont déjà appliqués à isoler telle ou telle fraction subcellulaire de l'épiderme chez le rat, la souris ou chez l'homme.

Citons : les travaux de ROSETT et Coll. (94) qui ont isolé par ultracentrifugation une fraction mitochondriale de l'épiderme chez le rat adulte ; IQBAL et WYNN (77) ainsi que DICKEN et DECKER (74) qui proposent deux méthodes voisines basées sur l'ultracentrifugation pour isoler les lysosomes de l'épiderme.

Après s'être débarrassés d'un certain nombre de contaminants (Noyaux, Mitochondries etc ...) par centrifugation à 30.000 g, FREEDBERG (95) ou ROGERS (96) sont parvenus à isoler des ribosomes de l'épiderme ou du follicule pileux.

Citons encore les travaux de BHATTACHARAYA et CARRUTHERS (97) qui ont essayé d'isoler les composants subcellulaires de l'épiderme humain.

Cependant, toutes ces méthodes restent criticables.

En effet, rares sont les auteurs qui associent pour identifier le matériel qu'ils viennent d'extraire une étude enzymatique à une étude morphologique et ceci systématiquement sur chaque culot extrait.

L'association de ces deux critères pour identifier une fraction et apprécier l'importance des contaminants semble pourtant indispensable.

Cependant, il est vrai que la plupart des auteurs précités ont cherché à isoler sans plus un système enzymatique de haute activité spécifique.

Le but ici recherché est différent puisqu'il s'agit de préciser la localisation d'une molécule marquée au sein de la cellule. Il importera donc de connaître parfaitement la pureté de chaque culot ou de chaque zone du gradient. Pour ce type d'étude, nous proposons la technique d'extraction suivante :

1-2 Fractionnement par ultracentrifugation des organites subcellulaires épidermiques chez le rat adulte

1-2.1 Matériel

- Tampon phosphate 0,01 M. pH 7,3 . sucrose 0,25 M. (voir sa composition à la page 45)
- Solution de saccharose RP à 8,5 % (0,25 M) ; 10 % ; 30 % ; 60 % dans H_2O d.
- Bandes adhésives John's Manville
- Ultracentrifugeuse préparative réfrigérée BECKMAN-SPINCO modèle L 50
- Rotor à 4 godets mobiles : SW 36 BECKMAN
- Appareil pour réaliser des gradients continus (figure 2)
- Montage simple de récupération des zones de gradient (figure 3)

1-2.2 Protocole expérimental (figure 1)

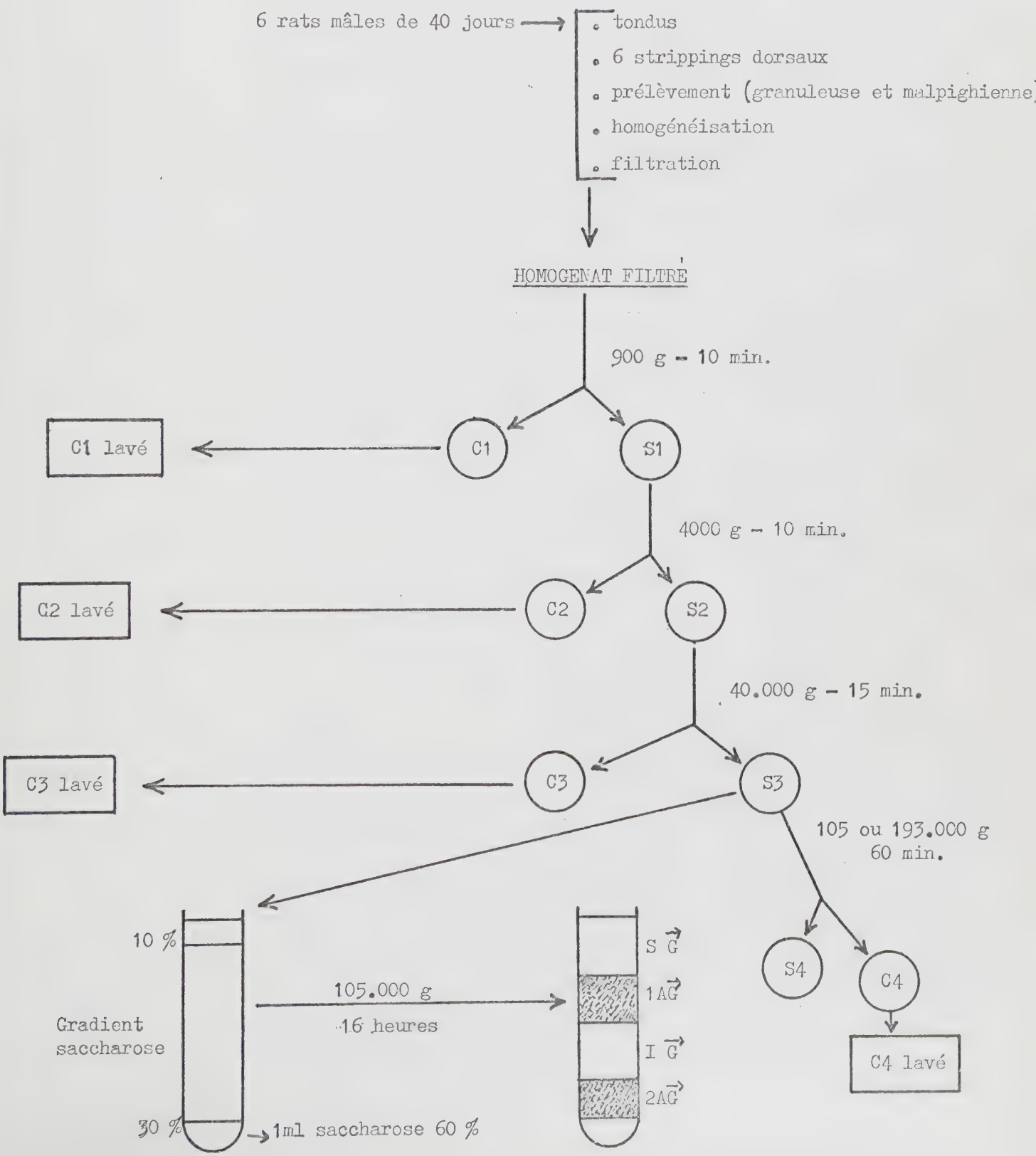
Après avoir tondu 6 rats mâles Wistar de 40 jours fraîchement sacrifiés, on procède à l'aide de bandes adhésives à 6 strippings de la peau dorsale préalablement séparée du corps de l'animal. Cette opération a pour but d'éliminer les poils et la cornée où l'on rencontre un matériel cellulaire hétérogène et de débarrasser les homogénats ultérieurs de la kératine qui contamine les culots de faible constante de sédimentation. L'examen histologique montre que pour des rats de cet âge 6 strippings sont nécessaires pour éliminer la cornée et le stratum lucidum.

Le reste de l'épiderme (couche granuleuse, couche malpighienne dont la couche basale) est séparé du derme par grattage à l'aide d'une lame de rasoir. Dans ces conditions, les glandes sébacées sont également entraînées. Ce matériel est homogénéisé dans 15 ml de tampon phosphate saccharose glacé à l'aide d'un tube de POTTER cylindrique dont la rotation du piston est de 1.500 RPM.

L'homogénéisation est assurée par 5 lents aller et retour du piston le long des parois du tube. L'homogénat est alors filtré sur 3 épaisseurs de gaze.

FIGURE 1

FRACTIONNEMENT PAR ULTRACENTRIFUGATION DES ORGANITES SUBCELLULAIRES EPIDERMIQUES CHEZ LE RAT ADULTE (PROTOCOLE EXPERIMENTAL)



On centrifuge le filtrat 10 minutes à 900 g : on obtient un culot C1 et un surnageant S1. Le culot C1 est repris par 5 ml de saccharose à 8,5 %, décollé à la baguette de verre du fond du tube et lavé par agitation énergique. La suspension est recentrifugée 10 minutes à 900 g. Le culot "C1 lavé" obtenu est ensuite repris par 5 ml d'eau distillée puis homogénéisé par 3 aller et retour du piston dans un tube de POTTER si on doit effectuer des mesures biochimiques sur le matériel extrait. Par contre, si le culot est destiné à être observé en microscopie électronique, "C1 lavé" est repris par 5 ml d'une solution de saccharose 0,25 M.

On obtient de la même manière C2, S2 et "C2 lavé" puis C3, S3 et "C3 lavé" en centrifugeant respectivement S1 à 4000 g pendant 10 minutes et S2 à 40.000 g pendant 15 minutes. "C2 et C3 lavés" sont ensuite traités comme "C1 lavé".

Deux millilitres du surnageant S3 sont ensuite couchés au sommet d'un gradient continu de saccharose 10 %- 30 % d'un volume de 10 ml reposant sur 1 ml de saccharose à 60 %. Ce gradient est réalisé à l'aide de l'appareil décrit à la figure 2. On centrifuge 16 heures à 105.000 g.

Les organites se localisent le long du gradient isopycnique dans les zones de saccharose correspondant à leur propre densité. On observe ainsi de haut en bas le long du gradient 4 zones dénommées :

- Surnageant du gradient = $S\overrightarrow{G}$
- Premier anneau du gradient = $1A\overrightarrow{G}$
- Fraction intermédiaire du gradient = $\overset{\circ}{I}\overrightarrow{G}$
- Deuxième anneau du gradient = $2A\overrightarrow{G}$

La position de ces 4 zones le long du gradient de densité est définie par le graphique représenté à la figure 4. Chacune des zones est prélevée goutte à goutte à l'aide d'un dispositif simple dont le montage est illustré par la figure 3.

Le volume de chacune des quatre fractions ainsi obtenues est ajusté à 3,5 ml avec de l'eau distillée lorsque l'on veut effectuer des mesures biochimiques sur le matériel extrait. Par contre, si l'on veut observer en microscopie électronique les organites en suspension dans les 4 zones du gradient on dilue avec de l'eau distillée : $1A\overrightarrow{G}$: 1,5 fois ; $\overset{\circ}{I}\overrightarrow{G}$: 2,3 fois et $2A\overrightarrow{G}$: 3,2 fois.

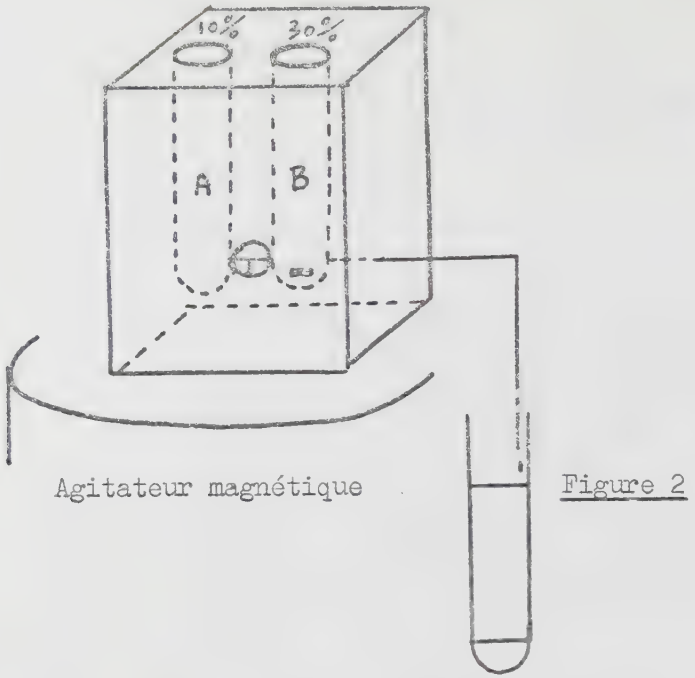


Figure 2

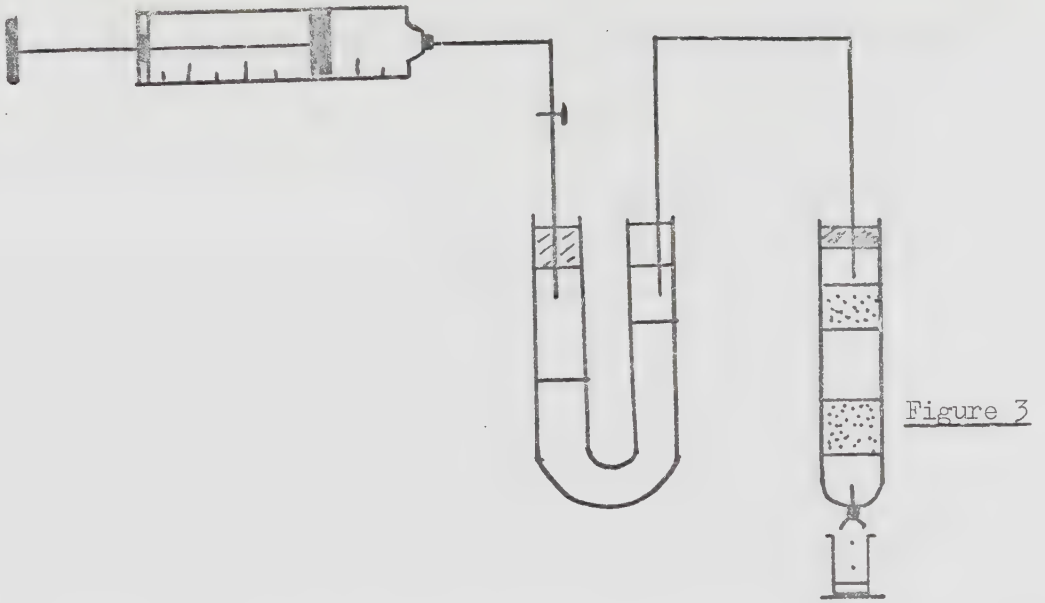


Figure 3

Figure 2 : Dispositif simple permettant de réaliser à partir de 2 solutions de saccharose différentes un gradient de densité continu. Pour que le gradient se forme correctement, il faut que les 2 colonnes A : saccharose à 10 % et B : saccharose à 30 % soient équilibrées lorsqu'on les met en communication. Ceci entraîne $P = P'$ d'où $V \neq V'$ puisque les densités des 2 solutions de saccharose sont différentes. En B un dispositif d'agitation assure la dilution progressive du saccharose à 30 % par le saccharose à 10 %, le système étant en rééquilibre constant dès l'écoulement des solutions. Le gradient est directement reçu dans un tube à centrifuger du rotor SW 36.

Figure 3 : Dispositif permettant de récupérer les zones du gradient par poussée de la colonne. Après avoir créé une légère dépression dans le système, les zones du gradient sont récupérées goutte à goutte par la base du tube.

- POSITION DES ORGANITES DE S3 le LONG DU GRADIENT DE DENSITE APRES ULTRACENTRIFUGATION -

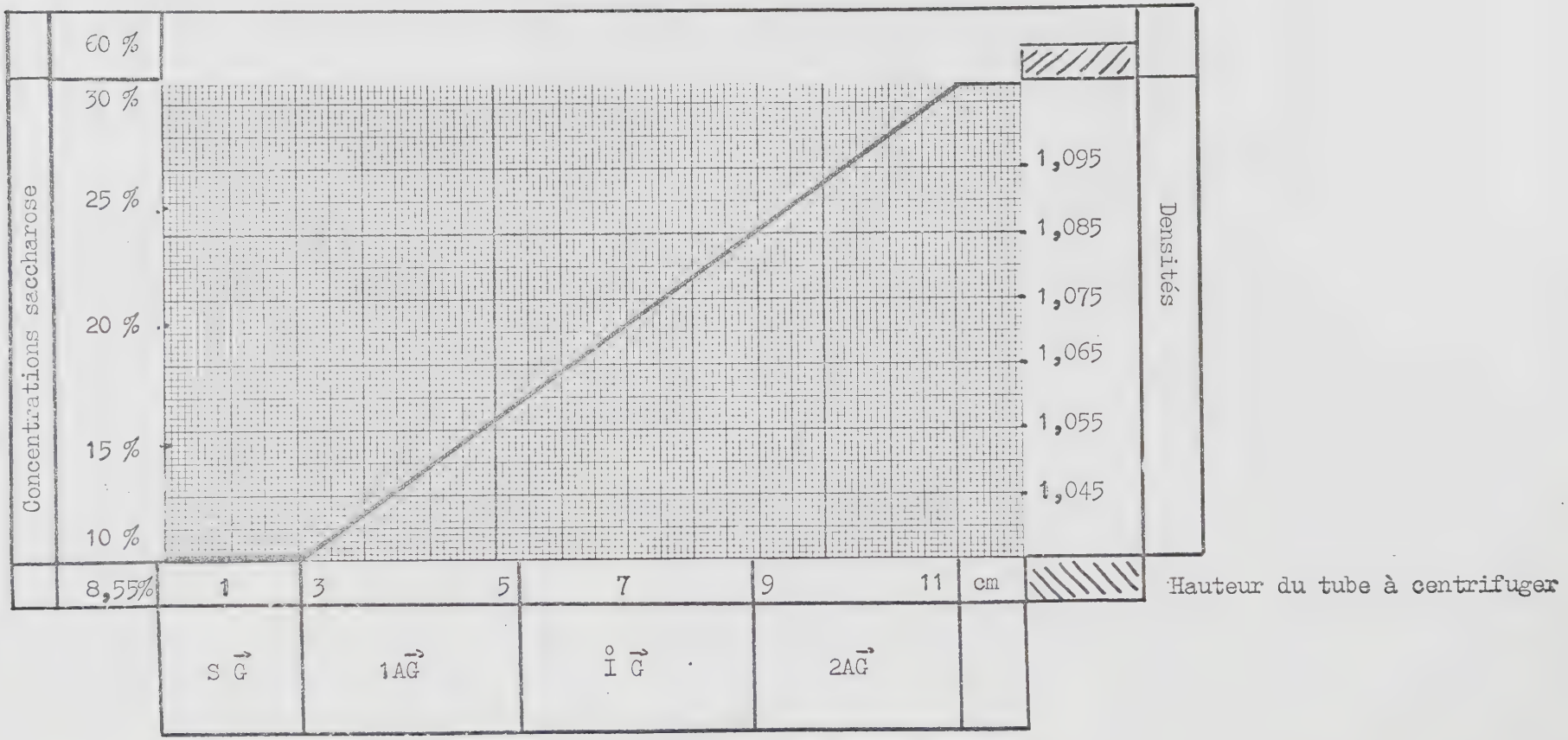


FIGURE 4

Cette opération a pour but de ramener la concentration des solutions de saccharose des quatre zones prélevées sur le gradient à une concentration voisine de 8,5 %. Après avoir complété à 13 ml avec une solution de saccharose à 8,5 % chaque tube pour éviter leur écrasement lors de trop fortes accélérations, on recueille les organites en suspension dans S $\vec{G}$, 1A$\vec{G}$, I $\vec{G}$, 2A$\vec{G}$ en centrifugeant 1 heure à 105.000 g. Les culots obtenus sont alors repris par 5 ml d'une solution de saccharose à 8,5 %, puis après traitement, observés en microscopie électronique.

D'autre part, le reste de S3 non utilisé pour le gradient est centrifugé 60 minutes à 193.000 g après avoir complété le volume à 13 ml avec une solution de saccharose à 8,5 %. On obtient ainsi un culot C4 et un surnageant S4 débarrassés d'organites. On traite C4 comme les culots C1 - C2 - C3 obtenus précédemment.

Sur chacune des fractions extraites on procède à un certain nombre de mesures biochimiques et à des observations en microscopie électronique.

2) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

2-1 Matériel

- Ultramicrotome REICHTER OMU 2
- Microscope électronique PHILIPS 300
- Solutions de fixation, de coloration; bains plastiques.

  - Tampon phosphate : pH 7,2 - 0,1 M.

    A) Na_2HPO_4, 12 H_2O ..... 35,8 g

    B) NaH_2PO_4, H_2O ..... 13,8 g

    A 780 ml de A et 220 ml de B on ajoute 2,03 g de $MgCl_2$, 6 H_2O.

  - Glutaraldéhyde : on prépare au moment de l'emploi à partir d'une solution à 70 % une solution à 3 % dans du tampon phosphate, $MgCl_2$.

  - Acide osmique : Après avoir lavé au mélange sulfochromique l'ampoule de conditionnement ainsi que le matériel devant être au contact de la solution afin d'éliminer toute trace de lipides, on prépare une solution mère d'acide osmique à 4 % stockable à + 4° C.

Au moment de l'emploi, on prépare une solution fille à 1,5 % dans le tampon phosphate.

- Acétate d'uranyle: On prépare une solution à 5% dans de l'eau distillée. Cette solution est ensuite filtrée sur filtre MILLIPORE 0,22 µ.

- Solutions alcooliques à 70° , 95° ; alcool absolu.

- EPON :

A	Epon 812	62 ml
	Dodecenyl succinic anhydre (DDSA)...	100 ml
B	Epon 812	100 ml
	Nadic méthyl anhydre (NMA).....	89 ml

On mélange extemporanément 4 volumes de A et 6 volumes de B. Ce mélange est additionné de diméthylaminométhylphénol (DPM 30) dans la proportion de 2,5 %.

- Citrate de plomb : On prépare une solution de nitrate de plomb à 1,33 g pour 30 ml d'eau distillée. Après agitation on ajoute à cette solution 2,14 g de citrate de sodium.

- Cire de dentiste

- Solution de soude: Soude normale 8 ml .....q.s.p. 50 ml d'eau.

2-2 Protocole expérimental

Les organites en suspension dans une solution de saccharose 0,25 M sont fixés à température du laboratoire pendant 10 minutes par traitement à la glutaraldéhyde à 3 % (V/V). Puis on récupère les culots à la vitesse où les organites ont été recueillis au cours du fractionnement cellulaire. Cette opération est reconduite une seconde fois en laissant 20 minutes de contact entre les organites et le fixateur. Les culots contenant les organites fixés sont alors rincés par quelques millilitres de tampon phosphate. Les différents culots sont de nouveau récupérés, comme il l'a été énoncé plus haut, puis traités à l'acide osmique pendant 45 minutes. On procède ensuite à 3 rinçages consécutifs à l'eau distillée. On imprègne alors le matériel fixé par de l'acétate d'uranyle : les culots sont laissés 1 heure en contact avec la solution d'acétate d'uranyle à l'obscurité et à la température du laboratoire. Cette imprégnation est suivie de 2 rinçages de 5 minutes à l'eau distillée.

On déshydrate le matériel fixé et coloré par un bain de 15 minutes dans de l'alcool à 70° ; ce premier bain est suivi d'un second bain dans de l'alcool à 95° pendant 20 minutes, puis de 3 bains de 10 minutes dans de l'alcool absolu. On procède ensuite à une préincubation du matériel en le plongeant une heure dans un mélange oxyde de propylène-Epon 3/1 . Le matériel est enfin inclus dans de l'Epon qui se polymérise par séjour de 24 heures à l'étuve à 60° C. Le matériel inclus est ensuite débité à l'ultramicrotome. Les coupes ont une épaisseur de 500 à 600 Å . Elles sont colorées par immersion pendant quelques instants dans un bain de citrate de plomb, séchées à l'air ambiant pendant 30 minutes puis placées sur des grilles en or à l'intérieur d'une boite de PETRI saturée par une atmosphère sodique. Chaque préparation reçoit une goutte de cire de dentiste. Le contact est maintenu 3 minutes. Au bout de ce temps, on procède à 3 rinçages des grilles dans de l'eau distillée. Après séchage, les préparations sont directement observables au microscope électronique.

Si ce sont des biopsies de tissus entiers que l'on veut observer en microscopie électronique, le protocole de traitement de ces tissus est identique à celui qui vient d'être décrit pour les organites. Cependant, pour la fixation à la glutaraldéhyde le temps de contact sera de 2 heures au lieu de 10 minutes. D'autre part, on laisse 1 heure 30 de contact entre l'acide osmique et les tissus au lieu de 45 minutes comme dans le cas des organites.

3) ANALYSE BIOCHIMIQUE DU MATERIEL EXTRAIT

Sur chaque culot recueilli et sur chaque zone du gradient, on dose les protéines, on détermine l'activité des cytochromes oxydases (enzymes marqueurs des mitochondries), l'activité des phosphatases acides (enzymes marqueurs des lysosomes), on dose les acides ribonucléiques et l'activité des glucose 6 phosphatases pour caractériser les microsomes (76).

3-1 Dosage des protéines

La détermination de la teneur en protéines dans chaque fraction va permettre de mesurer l'activité spécifique des enzymes contenues dans le matériel extrait. Ces protéines sont dosées selon la méthode de LOWRY, déjà décrite à la page 47.

3-2 Dosage des acides ribonucléiques

La technique utilisée pour le dosage des ARN est celle de MOULE (98) qui consiste à doser par de l'orcinol le ribose libéré par hydrolyse acide d'une aliquote du matériel à analyser. Il est important que l'hydrolyse se déroule en absence totale de saccharose qui "caramélise" lorsque les tubes sont portés au bain-marie. Le dosage du ribose sera donc effectué sur des culots repris par 5 ml d'eau distillée. A cet effet, il y a lieu de faire sédimenter les organites en suspension dans les zones du gradient comme il a déjà été décrit en 1-2.2, puis de disperser les organites dans 3 ml d'eau avant dosage.

Protocole expérimental : on dépose dans des tubes à essai 1 ml de la solution à doser - 1 ml d'acide perchlorique 0,1 M et 2 ml du réactif $CuCl_2$, $2H_2O$ à 70 mg % d'acide chlorhydrique concentré, solution à laquelle on a ajouté extemporanément 0,5 g % d'orcinol cristallisé. On porte ce mélange 20 minutes au bain-marie à 100° C puis après refroidissement, on lit la coloration qui s'est développée à 665 nm contre un témoin ne contenant que les réactifs. L'activité totale contenue dans chaque culot, compte-tenu des dilutions apportées, est ensuite déterminée en se rapportant à la courbe étalon établie par MOULE et publiée par LOISELEUR (99) . L'activité spécifique est exprimée en ramenant par mg de protéines l'activité totale.

3-3 Dosage des cytochromes oxydases

La cytochrome oxydase est l'enzyme marqueur de la fraction mitochondriale (76) . Cette enzyme oxyde le fer ferreux du cytochrome réduit. La réaction est suivie à 553 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du cytochrome C réduit, le cytochrome C oxydé n'absorbant pas à cette longueur d'onde. La technique de dosage utilisée est celle rapportée par SHAMBERGER (100).

. 2 cytochrome Fe^{++} ——— cytochr. oxydase ⟶ 2 cytochrome Fe^{+++}
(réduit, ferreux, rose) (oxydé, ferrique, jaune)

Préparation des réactifs :

. $S_2O_4Na_2$, $2H_2O$ ..... 1,2 M ..... 252 g/l. H_2O

. Tampon phosphate 30 mM pH 7,4

A) NaH_2PO_4, H_2O ..... 414 mg % ml H_2O

B) Na_2HPO_4, $12H_2O$ ..... 358 mg % ml H_2O

19 ml de A + 81 ml de B ⟶ tampon phosphate 30 mM pH 7,4.

. Cytochrome C (Fluka) PM = 16.500 ..... 8,4 mg pour 30 ml de tampon phosphate = Solution 0,05 M .

. La solution de cytochrome C préparée ci-dessus est sous une forme oxydée, il convient de la réduire par addition de 0,1 ml de $Na_2S_2O_4$ fraîchement préparé. La préparation est agitée vigoureusement plusieurs minutes pour détruire l'excès de dithionite formé.

Protocole expérimental : A 3 ml d'un tampon phosphate de sodium 30 mM, pH 7,4, contenant 0,05 M de cytochrome C réduit, on ajoute 0,1 ml de la préparation enzymatique. On lit l'absorption immédiatement puis toutes les 15 secondes à 553 nm, à température ambiante et contre un témoin contenant tous les réactifs sauf l'enzyme. La réaction est suivie pendant 10 à 15 minutes. Aprés avoir tracé DO = f(t), on calcule la pente de la courbe. L'activité totale est exprimée en Δ DO/minute après avoir corrigé les résultats en fonction des dilutions apportées aux préparations enzymatiques. L'activité spécifique est exprimée en Δ DO/minute/mg de protéines.

3-4 Dosage des phosphatases acides : β glycérophosphatases :

L'activité des β glycérophosphatases (enzymes marqueurs de la fraction lysosomale) (76) est déterminée par la méthode de GIANETTO et DE DUVE (78) (76) en incubant 4 heures à 37 ° C les préparations enzymatiques avec un substrat β glycérophosphate. La réaction se déroule à pH 5,4 . Le choix du pH est justifié par les résultats d'une expérience que l'on trouvera développée page 52.

Préparation des réactifs :

. Tampon acétique-acétate
  A) acide acétique cristallisable 0,3 g %ml d'eau distillée
  B) acétate de sodium 680 mg % ml d'eau distillée

Mélanger 30 ml de A et 70 ml de B

. Tampon substrat

On dissout 1,575 mg de β glycérophosphate de sodium (0,05 M) dans 100 ml de tampon acétique acétate.

On ajuste le pH à 5,4 par quelques gouttes d'acide acétique (N) puis on ajoute à cette solution 0,1 % de Triton X 100 afin de labiliser la membrane lysosomale normalement peu perméable au β glycérophosphate.

Protocole expérimental :

On ajoute 0,1 ml de la solution enzymatique à 2,9 ml de tampon substrat. L'incubation se déroule à 37 °C pendant 4 heures. La réaction est stoppée par addition de 1 ml d'acide trichloracétique à 50 % . Après centrifugation 15 minutes à 70.000 g, on dose le phosphore du surnageant selon la méthode de FISKE et SUBBAROW, déjà exposée à la page 48.

Le dosage du phosphore s'effectue sur 1 ml de surnageant pour les fractions C1, C3 et S $\vec{G}$; sur 2 ml pour la fraction C2 et sur 3 ml pour les autres fractions. La lecture s'effectue contre les témoins où la solution enzymatique n'a été ajoutée qu'à la fin de l'incubation après addition d'acide trichloracétique.

Après corrections dues aux différentes dilutions, on exprime l'activité totale de chaque fraction en µg de phosphore libéré à partir du β glycérophosphate et l'activité spécifique en µg de phosphore par mg de protéines.

3-5 Dosage des glucoses 6 phosphatases :

Nous avons déterminé l'activité des glucoses 6 phosphatases (enzymes marqueurs de la fraction microsomale) (76) selon une méthode adaptée à celle proposée par GIANETTO et DE DUVE (78) (76). En effet, le tableau I montre que les conditions de détermination de l'activité des β glycérophosphatases et des glucoses 6 phosphatases sont trés proches. De plus, on sait que les phosphatases acides sont peu spécifiques (54) (55). Enfin, le pH optimum d'activité des glucoses 6 phosphatases est de 6,5 ; l'étude de l'activité des β glycérophosphatases en fonction du pH a montré qu'à pH 6,5, ces enzymes ont encore 45 % de leur activité. Il était donc important de contrôler une interférence éventuelle des β glycérophosphatases acides dans les dosage des glucoses 6 phosphatases épidermiques du rat.

3-5.1 Interférence des β glycérophosphatases acides dans le dosage des glucoses 6 phosphatases :

Pour étudier ce problème, nous avons mis à profit le fait que le tartrate de benzyl thio-2-éthylamine inhibe les phosphatases acides (voir seconde partie page 65). Les dosages des β glycérophosphatases et des glucoses 6 phosphatases ont donc été effectués selon les techniques de GIANETTO-DE DUVE (78) (76).

	GLYCEROPHOSPHATASES	GLUCOSE 6-PHOSPHATASES
. Substrat (S)	β Glycérophosphate 0,05 M	Glucose 6 phosphate 0,04 M
. Tampon (T)	Acétique-acétate 0,05 M Triton X 100 0,1 %	Histidine 0,007 M EDTA 0,001 M
. pH	5,4	6,5
. Volume (T.S)	2,9 ml	2,8 ml
. Solut. enzym.	0,1 ml	0,2 ml
. Température	37 ° C	37 ° C
. Temps incubation	4 h	5 h
. Fin incubation	1 ml T.C.A. 50 %	1 ml T.C.A. 50 %
. Contrôle activité	Dosage phosphore	Dosage phosphore

- CONDITIONS DE DOSAGE DES β GLYCEROPHOSPHATASES ACIDES ET DES GLUCOSE 6-PHOSPHATASES

(D'APRES GIANETTO ET DE DUVE (78) (76))

TABLEAU I

Cependant, nous avons ajouté ou non dans les milieux d'incubation du tartrate de BTE, comme on peut le voir sur le tableau II.
Pour cette étude, la source enzymatique provient d'un surnageant obtenu par centrifugation de 15 minutes à 40.000 g d'un broyat d'épiderme de rat. Ce surnageant qui doit contenir les fractions lysosomales et microsomales est de nouveau centrifugé à 105.000 g. Le culot obtenu, remis en suspension dans 5 ml d'eau distillée est utilisé comme source enzymatique pour les dosages.

L'examen des résultats (tableau II) montre que l'extrait épidermique possède une activité β glycérophosphatasique (essai n° 1). L'étude de l'action du tartrate de BTE sur les β glycérophosphatases montre que son action inhibitrice est proportionnelle à sa concentration dans le milieu d'incubation (essais 2 à 8). Dans les conditions expérimentales utilisées : 3.10^{-5}M de tartrate de BTE inhibent totalement les β glycérophosphatases (essai n°7). Ceci entraîne que dans l'essai n° 15 le phosphore dosé correspond à du phosphore libéré uniquement par les glucose 6 phosphatases. L'écart observé entre les essais 9 et 15 montre donc que les β glycérophosphatases peuvent interférer dans la mesure de l'activité des glucose 6 phosphatases. Le fait que l'activité des glucose 6 phosphatases se maintienne à 12 µg de phosphore libéré par heure et par milligramme de protéines entraîne que le tartrate de BTE est sans action sur les glucose 6 phosphatases.

Si l'on considère la seconde partie du tableau (dosage des glucose 6 phosphatases) on s'aperçoit qu'il faut une quantité moindre de BTE pour inhiber l'action des β glycérophosphatases sur le glucose 6 phosphate que dans le cas où le substrat est le β glycérophosphate. Ainsi, à la concentration de 4.10^{-6}M de BTE, les β glycérophosphatases sont déjà totalement inhibées vis-à-vis du glucose 6 phosphate. Ceci est logique puisque l'affinité des β glycérophosphatases pour le glucose 6 phosphate est moindre que pour leur propre substrat par définition.

Nous devons donc conclure que si l'on veut doser correctement les glucose 6 phosphatases épidermiques chez le rat, il est nécessaire d'inhiber auparavant les β glycérophosphatases.
La méthode de dosage adaptée à celle de GIANATTO-DE DUVE que nous proposons maintenant tient compte de cette remarque.

β GLYCEROPHOSPHATASES		TARTRATE DE BTE	GLUCOSE 6 PHOSPHATASES	
Essai	µg P.libéré/H/mg protéines	10^{-5}M	µg P.libéré/H/mg protéines	Essai
1	222	0	25,2	9
2	61	0,4	11,8	10
3	34	0,6	11,9	11
4	29	0,8	12,2	12
5	20	1,0	12,2	13
6	9	2,0	11,8	14
7	1,5	3,0	12,2	15
8	0,5	4,0	11,8	16

- VARIATIONS DE L'ACTIVITE DES β GLYCEROPHOSPHATASES ACIDES ET DES GLUCOSE 6 PHOSPHATASES D'UN BROYAT D'EPIDERME DE RAT EN FONCTION DE L'ADDITION DE TARTRATE DE BTE DANS LE MILIEU D'INCUBATION -

TABLEAU II

3-5.2 Dosage des glucose 6 phosphatases :

Ainsi, les glucose 6 phosphatases sont testées à 37 ° C dans un milieu contenant 0,04 M de glucose 6 phosphate, 0,007 M de (DL) Histidine, 0,001 M d'EDTA et 3.10^{-5} M de tartrate de BTE pendant 5 heures à un pH final de 6,5.

Réactifs :

. Glucose 6 phosphate	1,216	mg %
. EDTA	33,8	mg %
. (DL) Histidine	108	mg %
. Tartrate de BTE	520	mg %

Ces différents produits sont mis en solution dans 95 ml d'eau distillée. Après ajustement du pH 6,5 par quelques gouttes d'HCl (N), on complète le volume à 100 ml.

Protocole expérimental :

On fait incuber dans les conditions définies plus haut 2,8 ml de tampon substrat avec 0,2 ml de C1, C2, C3 ou 2,6 ml de tampon substrat avec 0,4 ml de S $\vec{G}$, 1A$\vec{G}$, I $\vec{G}$, 2A$\vec{G}$. Après incubation, on arrête la réaction par 1 ml d'acide trichloracétique à 50 % . On ajoute alors 0,2 ml ou 0,4 ml d'enzyme dans des tubes témoins ayant incubé sans l'enzyme. Après centrifugation (70.000 g - 15 minutes) on dose le phosphore du surnageant selon la méthode déjà exposée page 48. Les prises d'essai sont pour toutes les fractions de 3 ml sauf pour la fraction S $\vec{G}$ où elle n'est que de 1 ml. La lecture s'effectue contre les témoins où l'enzyme n'a été ajoutée qu'après addition d'acide trichloracétique. Après corrections dues aux dilutions, on exprime l'activité totale en µg de phosphore libéré à partir du glucose 6 phosphate et l'activité spécifique en µg de phosphore par mg de protéines.

3-6 Analyse de S3 et S4 après passage sur colonne "SEPHADEX G 25 fine"

Il était intéressant de contrôler si l'un des métabolites du BTE se liait éventuellement à une protéine ou à un polypetide soluble du surnageant S4 (surnageant 193.000 g). Dans ce but les surnageants S3 et S4 ont été déposés au sommet d'une colonne de "SEPHADEX G 25 fine," de diamètre 25 mm et d'une hauteur de 400 mm.

Les grains du "Séphadex" sont en suspension dans le tampon phosphate utilisé lors de l'extraction des organites.

L'élution se fait à l'aide de ce même tampon avec un débit de 70 ml/heure. Le volume mort de la colonne, mesuré par passage d'une solution de bleu-Dextran 2000, a été calculé à 82 ml. Dans ces conditions, les polypeptides et les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 5.000 ainsi que les organites en suspension dans S3 (surnageant 40.000 g) sont exclus de la colonne avec le volume mort. Les polypeptides de poids moléculaire inférieur sont retenus dans les pores des grains du gel pendant un temps plus ou moins long qui dépend de leur poids moléculaire. On recueille ainsi tous les 3 ml, à l'aide d'un collecteur de fraction : l'éluant et les substances qu'il entraîne. On réserve 1 ml pour la détermination de la radioactivité et sur les 2 ml restants on mesure l'absorption à 210 et 280 nm.

4) RECHERCHE DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES METABOLITES DU CHLORHYDRATE DE BENZYL-THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C DANS L'EPIDERME - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

On injecte IP 30 µCi de chlorhydrate de benzyl-thio-2-éthylamine d'activité spécifique 2,6 µCi/mg à 5 rats mâles de 40 jours. La molécule injectée est en solution dans 0,5 ml de sérum physiologique. Les animaux sont sacrifiés 3 heures après l'injection, l'épiderme est prélevé et les organites subcellulaires séparés, comme il a été défini au paragraphe 1-2. Ces organites sont identifiés comme il a été énoncé précédemment puis on détermine l'activité de chaque fraction isolée en reprenant le matériel en suspension dans du sucrose par de "l'INSTAGEL."

Les techniques de détermination d'activité ont été longuement décrites dans les chapitres "MATERIELS ET METHODES" des première et troisième parties. Les surnageants S3 et S4 sont, en outre analysés à 210 et 280 nm après passage sur colonne "SEPHADEX." Après corrections dues aux différentes dilutions, l'activité totale est exprimée en dpm et l'activité spécifique en dpm/mg de protéines.

Chapitre III

ANALYSE DES SURNAGEANTS S3 (40.000 g) ET S4 (193.000 g) APRES PASSAGE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 25 FINE

1) ANALYSE DU SURNAGEANT S3 (40.000 g) APRES PASSAGE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 25 FINE

La figure 5 montre que l'activité contenue dans une aliquote du surnageant S3 se décompose en 3 pics après passage sur colonne de "Sephadex G 25 fine."

Un premier pic que l'on recueille après passage de 75 à 86 ml d'éluant correspond à un métabolite ^{14}C du BTE fixé sur des protéines solubles dans le surnageant ou lié aux organites subcellulaires contenus dans S3. Ceci est attesté par les courbes d'absorption à 210 nm (maximum d'absorption de nombreuses substances) et à 280 nm (maximum d'absorption en UV des protéines).

Aucun des 2 autres pics élués par passage de 140 à 200 ml de tampon phosphate ne correspond à du BTE libre dans le surnageant puisque celui-ci ne sort de la colonne qu'après passage de 200 ml d'éluant. Ces 2 pics par ailleurs assez mal séparés ne peuvent correspondre qu'à des métabolites ^{14}C du BTE liés vraisemblablement à des peptides. (Rappelons en effet, à ce propos qu'il est exclu que la molécule entière soit liée aux protéines ou aux peptides puisque nous avons montré - cf 3ème partie - que celle-ci était entièrement métabolisée par l'organisme et que seule une "forme éthanolamine" était retenue au niveau cutané).

Les pics recueillis après passage de 140 à 200 ml d'éluant correspondent donc à un complexe "métabolite ^{14}C du BTE-peptide" de poids moléculaire d'environ 3.000 pour celui recueilli entre 140 et 165 ml et d'environ 1.500 pour celui recueilli entre 165 et 200 ml.

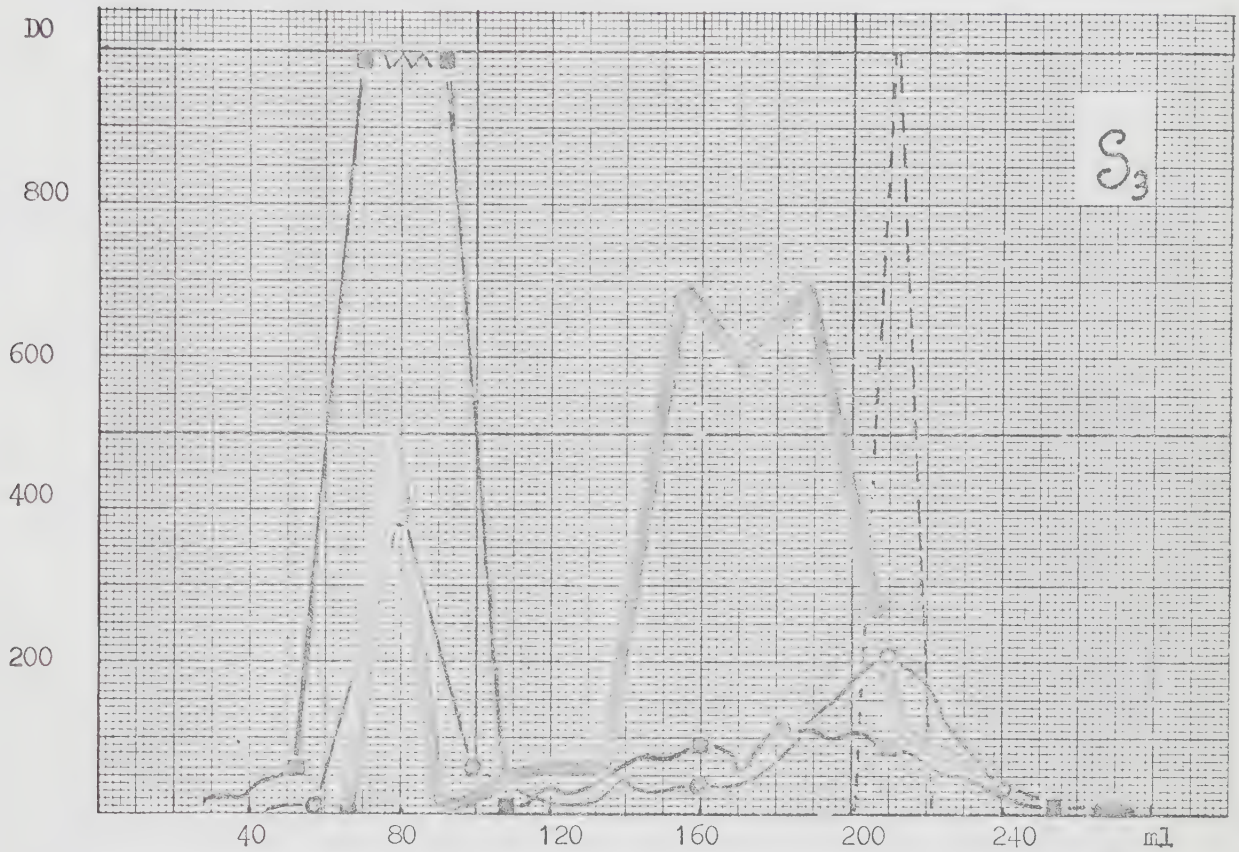
FIGURE 5

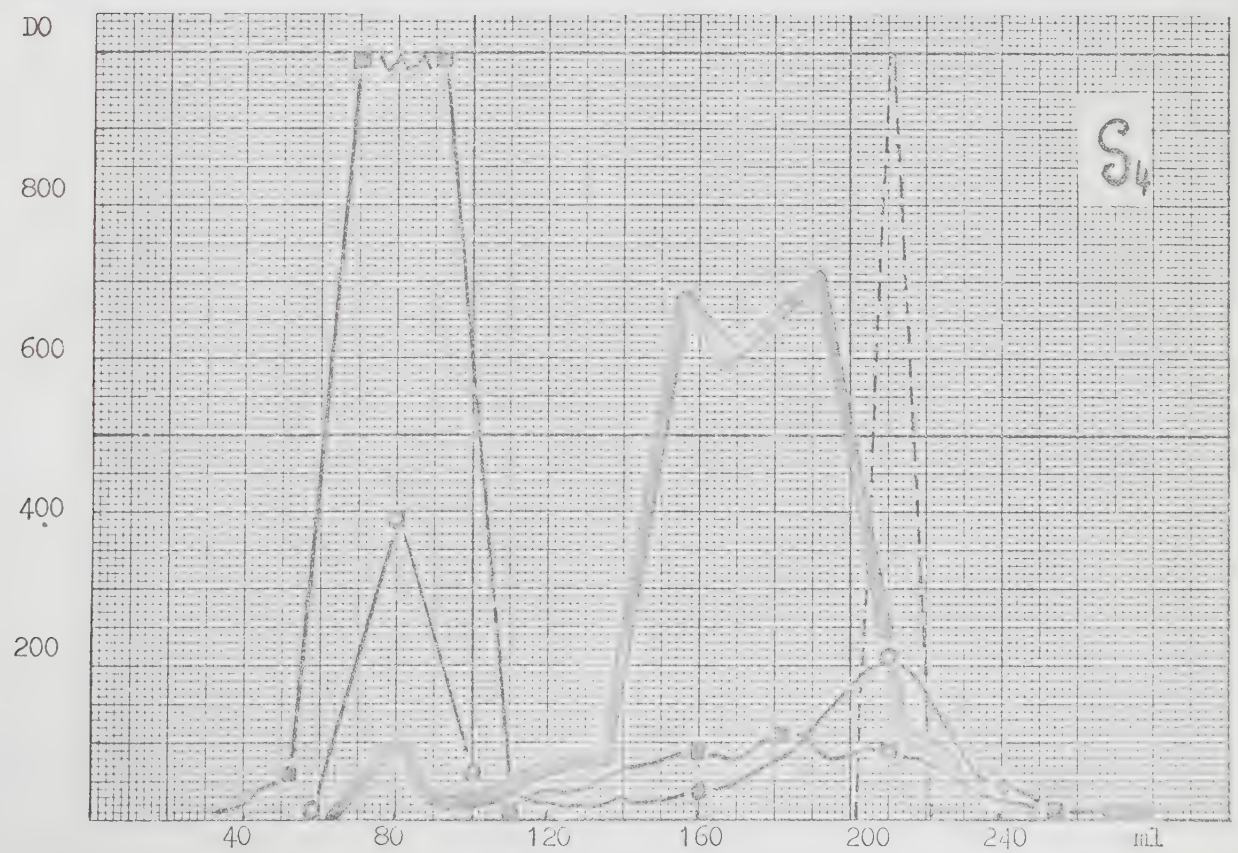
ANALYSE DE S3 et S4 APRES PASSAGE SUR SEPHADEX G 25 fine

absorption à 210 nm — Radioactivité : DPM.10^1

absorption à 280 nm ..... Pic de sortie du BTE

Déposés sur la colonne : 7720 DPM





Ces premiers résultats indiquent qu'une quantité appréciable de métabolites ^{14}C du BTE est liée, soit à des protéines solubles du surnageant, soit à des organites de haute constante de sédimentation.

2) ANALYSE DU SURNAGEANT S4 (193.000 g) APRES PASSAGE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 25 FINE

Si l'on admet que tous les organites en suspension dans S3 ont sédimenté à 193.000 g au cours d'une centrifugation de 60 minutes, on peut conclure que l'activité qui subsiste dans le premier pic de S4, après passage sur "Séphadex," correspond à un métabolite ^{14}C du BTE lié à des protéines solubles dans le surnageant. Cette quantité est en réalité trés faible.

Dans ces conditions, la chute d'activité dans la zone d'élution s'étendant de 60 à 100 ml entre, d'une part S3 et d'autre part S4, correspond à une activité de la molécule qui est liée à des organites dont la constante de sédimentation se situe entre 40.000 et 193.000 g.

Il est possible de déterminer la quantité de métabolites ^{14}C du BTE liée aux organites en calculant la surface respective des différents pics. Un tel calcul montre que les métabolites ^{14}C du BTE liés aux organites représentent 10,2 % - les métabolites non liés 89,8 % de l'activité totale contenue dans S3. Connaissant le nombre de dpm contenus dans S3 (115.830), il est possible d'énoncer que les métabolites liés aux organites correspondent à 11.800 dpm - les métabolites non liés à 104.000 dpm.

Chapitre IV

ETUDE DE LA REPARTITION DE L'ACTIVITE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C DANS LES ORGANITES SUBCELLULAIRES ISOLES PAR ULTRACENTRIFUGATION

L'étude de la répartition de l'activité contenue dans S3 et S4 après passage sur colonne de "Sephadex G 25 fine" a montré une activité liée à des organites de haute constante de sédimentation. L'analyse des différents culots ainsi que celle des zones du gradient doit maintenant donner plus de précisions quant aux types d'organites sur lesquels les métabolites du BTE se fixent. Cependant, dans un premier temps il convient d'identifier biochimiquement et morphologiquement le matériel extrait à chaque étape du fractionnement.

1) IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU MATERIEL EXTRAIT

1-1 Présentation des résultats

Le tableau III fait état de la teneur en protéines et en acides ribonucléiques ainsi que de l'activité des cytochromes oxydases, glycérophosphatases et glucoses 6 phosphatases de C1, C2, C3, $2\vec{AG}$, $^{o}\vec{IG}$, $1\vec{AG}$, $\vec{SG}$. Les figures 6 et 7 illustrent ces résultats.

Il a été précisé à propos de chaque dosage à quoi correspondaient les unités dans lesquelles sont exprimées les activités totales et spécifiques (Voir de la page 142 à la page 149).

Enfin, on trouve dans les pages qui suivent quelques photographies illustrant la nature des culots et des zones du gradient.

Cet ensemble de résultats a permis d'identifier biochimiquement et morphologiquement le matériel extrait.

	PROTEINES		A.R.N.		β GLYCEROPHOSPHATASES				GLUCOSE 6 PHOSPHATASES				CYTOCHROME-OXYDASES			
	AT.(µg)	%	AT.(µg)	%	AT.(µg)	%	AS.(µg/mg)	%	AT.(µg)	%	AS.(µg/mg)	%	AT.(ΔDO)	%	AS.(ΔDO/mg)	%
• C1	25.500	23	30.600	31,2	2.250	3	88	1,6	425	8,3	17	3	3,06	24,5	0,0120	3,8
• C2	2.325	2,1	930	0,95	1.000	1,3	430	7,6	87	1,7	37	6,6	5,55	44,3	0,2387	74,7
• C3	2.280	2,05	680	0,7	3.800	5,1	1.660	29,2	316	6,2	138	24,6	1,05	8,55	0,0463	14,6
• 2AG	12.810	11,5	8.970	9,15	15.400	20,7	1.202	21,1	750	14,7	58	10,3	2,85	22,8	0,0222	7
• HG	7.140	6,5	18.560	18,9	2.800	3,8	390	6,9	1.400	27,3	190	33,8	0	0	0	0
• 1AG	14.930	13,5	26.840	27,4	18.750	25,1	1.258	20	1.400	27,3	94	16,8	0	0	0	0
• SG	45.780	41,3	11.450*	11,7	30.660	41	670	11,8	750	14,7	28	5	0	0	0	0

• AT = Activité totale – • AS = Activité spécifique – • * ARN = dans la fraction sédimentable

– ETAT BIOCHIMIQUE DU MATERIEL EXTRAIT PAR ULTRACENTRIFUGATION D'UN HOMOGENAT D'EPIDERME DE RAT –

(% = Pourcentage d'activité dans chaque fraction par rapport à l'activité de toutes les fractions)

TABLEAU III

FIGURE 6

ETAT BIOCHIMIQUE DU MATERIEL EXTRAIT PAR ULTRACENTRIFUGATION D'UN HOMOGENAT D'EPIDERME DE RAT

→ % ACTIVITE TOTALE

+ ——— + Glycérophosphatases

o — — o Glucoses 6 phosphatases

Δ..... Δ Cytochromes oxydases

■ —.— ■ A.R.N.

▬▬ Répartition radioactivité X 10

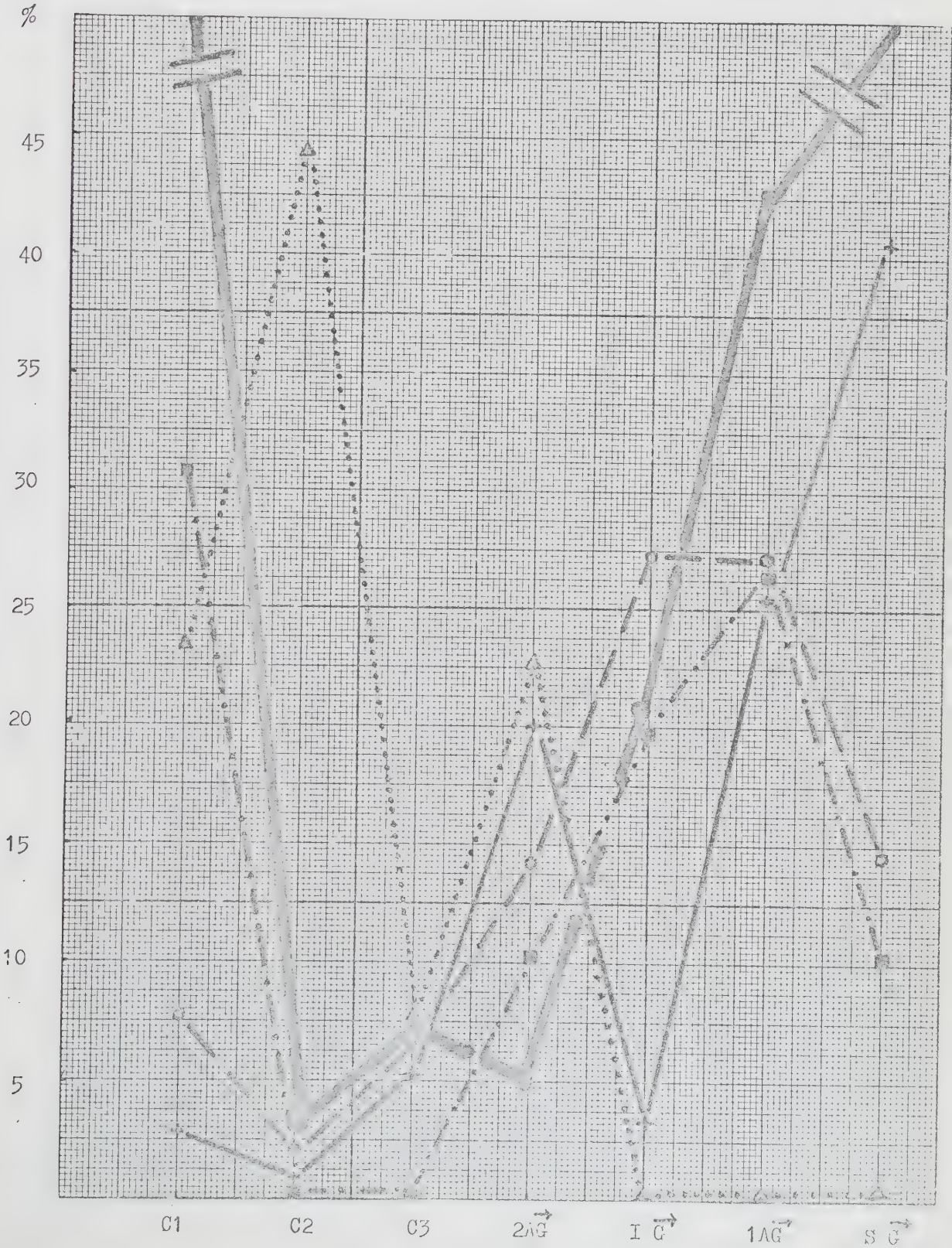


FIGURE 7

ETAT BIOCHIMIQUE DU MATERIEL EXTRAIT PAR ULTRACENTRIFUGATION D'UN HOMOGENAT D'EPIDERME DE RAT

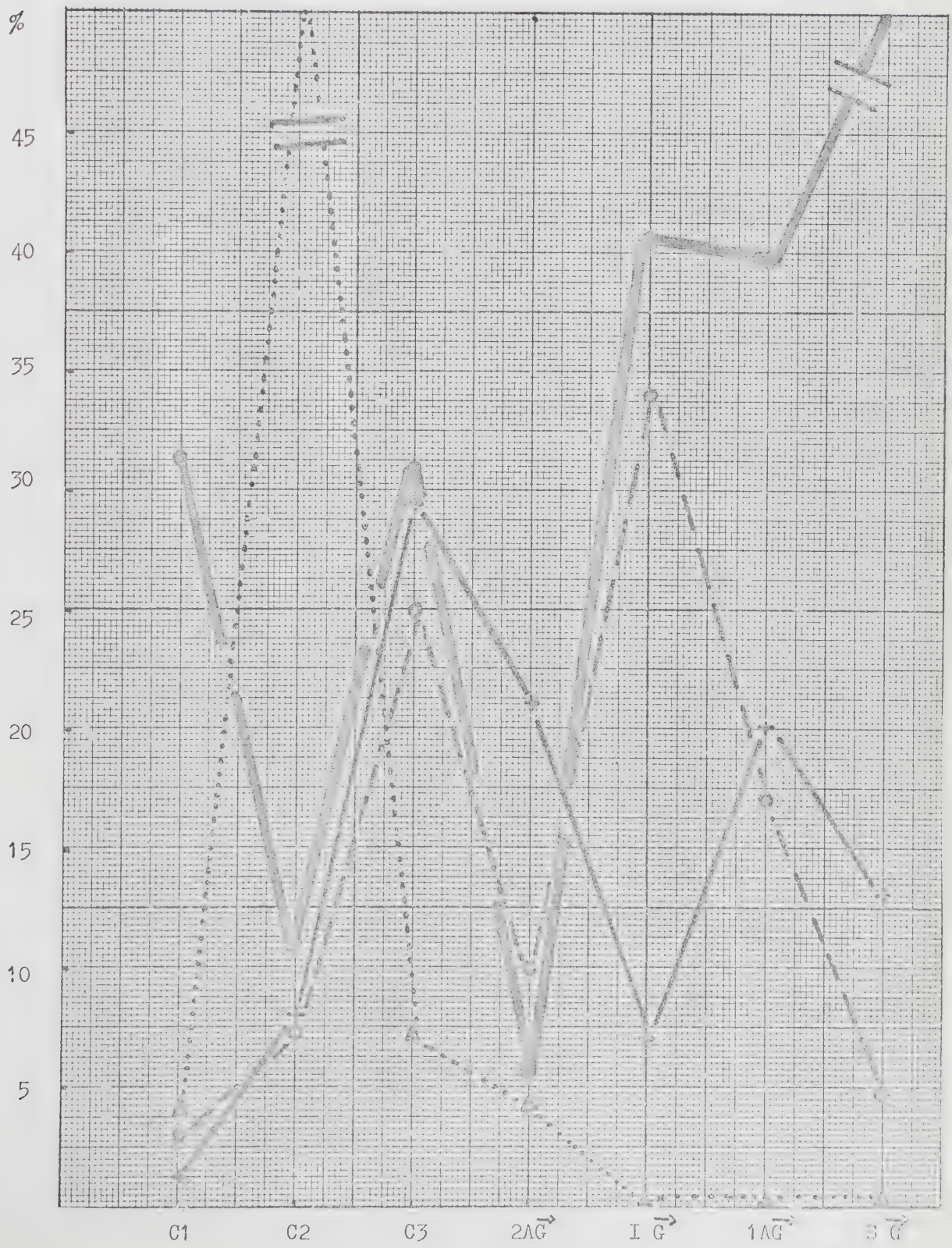
→ % ACTIVITE SPECIFIQUE

+ ——— + Glycérophosphatases

o — — o Glucose 6 phosphatases

Δ····· Δ Cytochrome oxydase

Répartition radioactivité X 4



1-2 Observation en microscopie électronique d'un épiderme de rat mâle Wistar de 40 jours

Il était nécessaire avant d'aborder l'étude de la nature morphologique des organites contenus dans les culots et les zones du gradient d'observer à divers grossissements quelques coupes d'une biopsie de peau totale de rat Wistar.

La figure 8 montre une coupe transversale de peau totale de rat Wistar : on distingue nettement sur la photographie la membrane basale (mb.b) séparant le derme de l'épiderme.
Dans le derme, la coupe permet d'observer les sections des faisceaux des fibres de collagène (f.collg).
Dans l'épiderme, la couche cornée est peu visible sur la photographie ; la couche granuleuse montre une seule couche de cellules riches en grains de kératohyaline (K.hy).
Dans la couche malpighienne, on distingue 2 rangées de cellules dont l'une présente un noyau (Noy.) entouré de nombreuses mitochondries(mito.

La figure 9 montre à plus fort grossissement le contenu cytoplasmique d'une cellule de la couche malpighienne. Cette photographie permet d'observer des replis membranaires entre les cellules.On distingue très bien dans le bas du cliché un lysosome caractérisé par sa membrane unitaire simple et sa plage claire au milieu d'un contenu plus dense.

1-3 Nature du culot C1 (900 g - 10 minutes)

Le culot C1 n'apparaît pas très homogène à l'observation en microscopie électronique ; ceci est observable sur la figure 10. On reconnaît surtout sur ce cliché des noyaux, de nombreuses mitochondries et quelques formations microsomales. Le culot C1 renferme donc principalement des noyaux qui ont été séparés du reste de la cellule. Cependant, on remarque que la membrane nucléaire reste entourée d'une bande de cytoplasme ; dans certains cas, elle a pu même être rompue.

La figure 11 montre les nombreuses fibres présentes dans le culot C1 ; ces fibres correspondent à du matériel kératinique. Ce cliché met en outre en évidence les desmosomes de la membrane intercellulaire.
Le culot C1 correspond donc à du matériel de faible constante de sédimentation.

FIGURE 8 - COUPE TRANSVERSALE DE PEAU TOTALE DE RAT WISTAR (X 11.000)

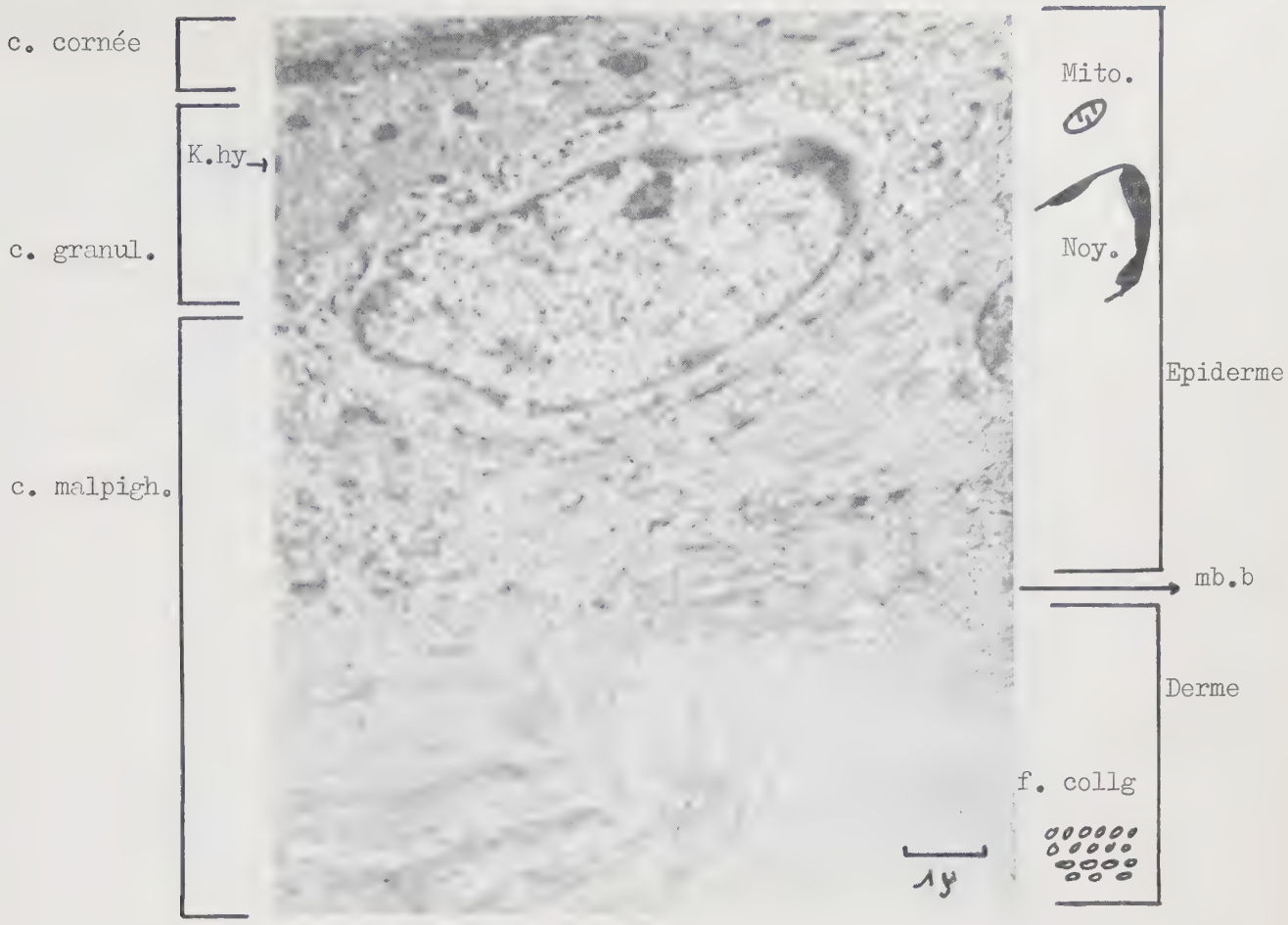


FIGURE 9 - COUPE DE PEAU TOTALE DE RAT WISTAR (CELLULE DE LA COUCHE MALPIGHIENNE)

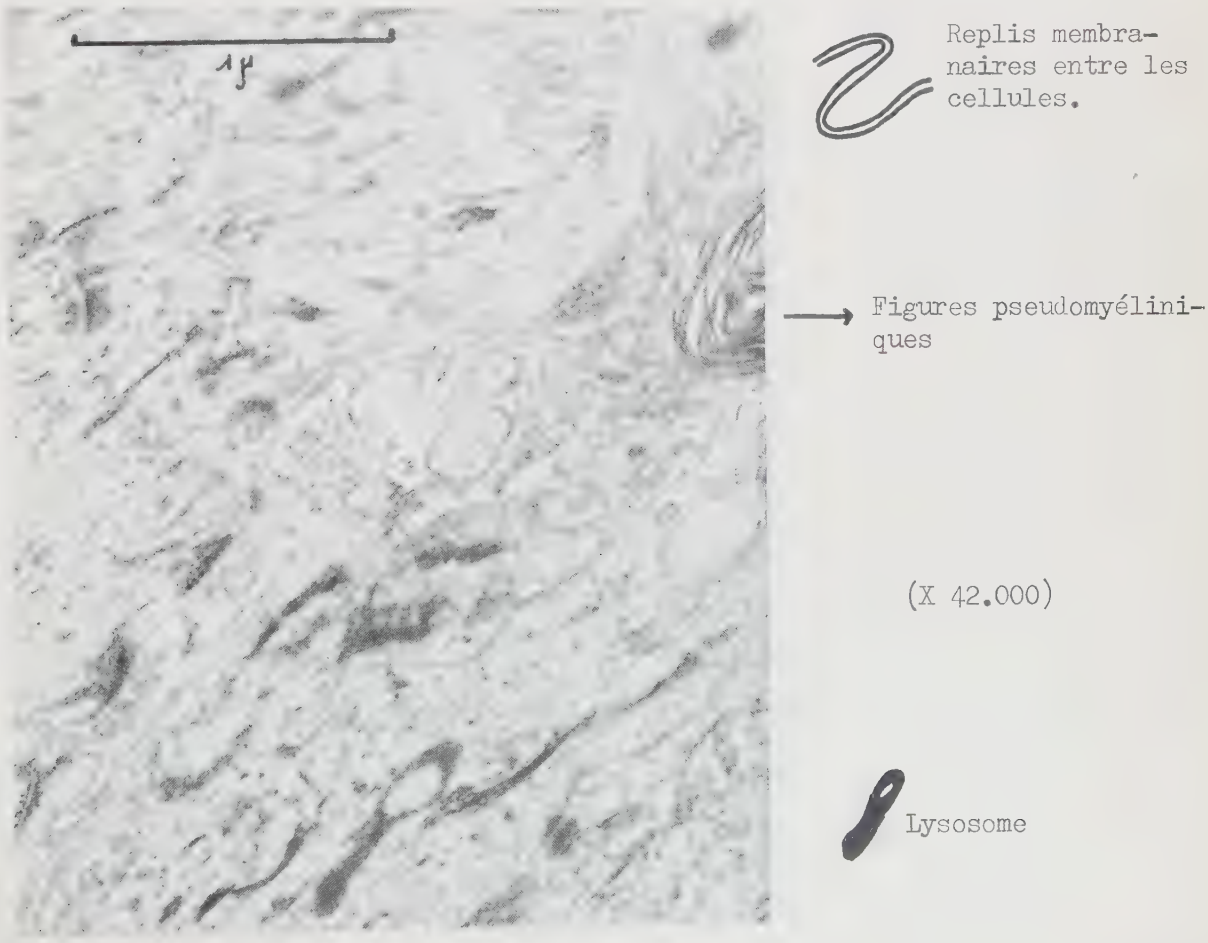
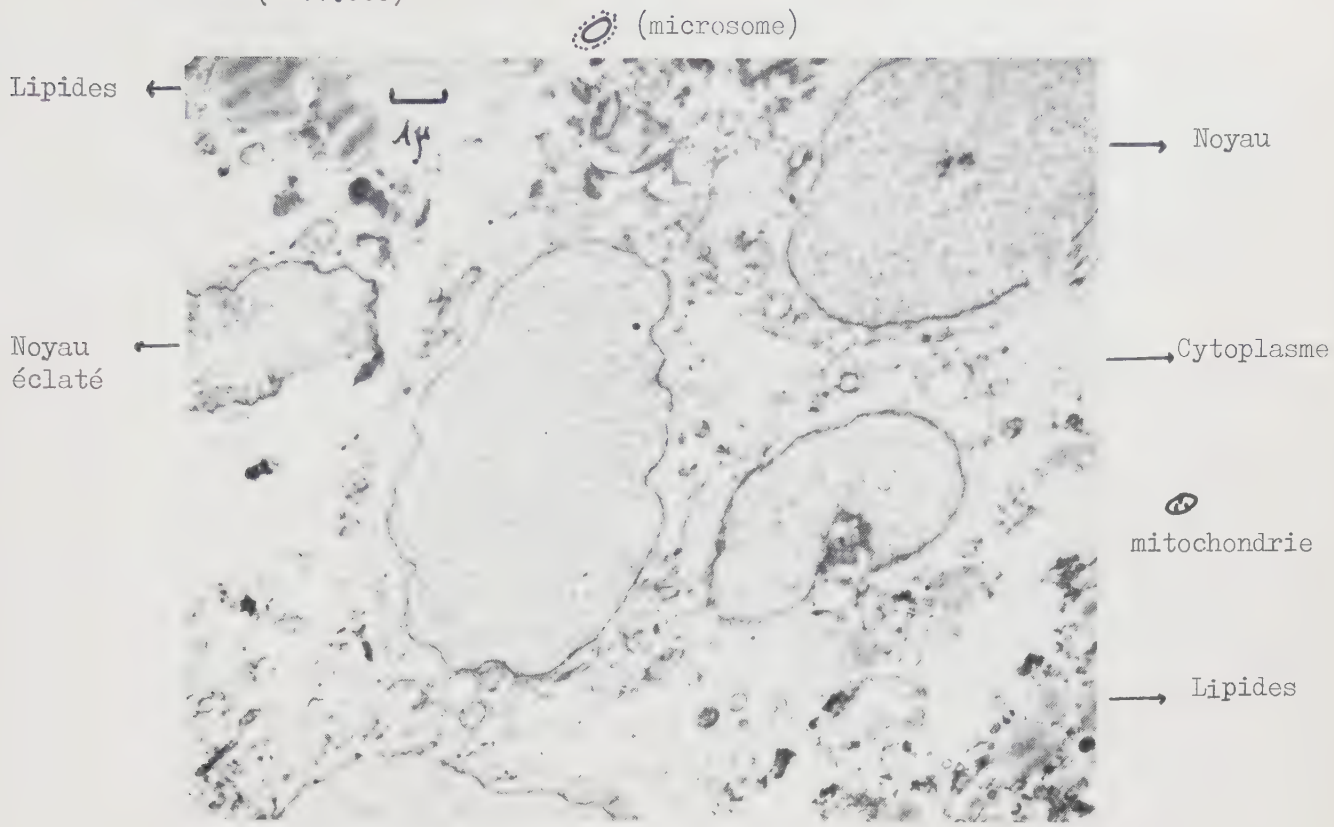


FIGURE 10 - ASPECT DU CULOT CI (900 g - 10 minutes)

(X 11.000)



....Si le culot C1 contient de nombreux noyaux, on reconnaît également des bandes de cytoplasme renfermant des mitochondries et quelques formations microsomales

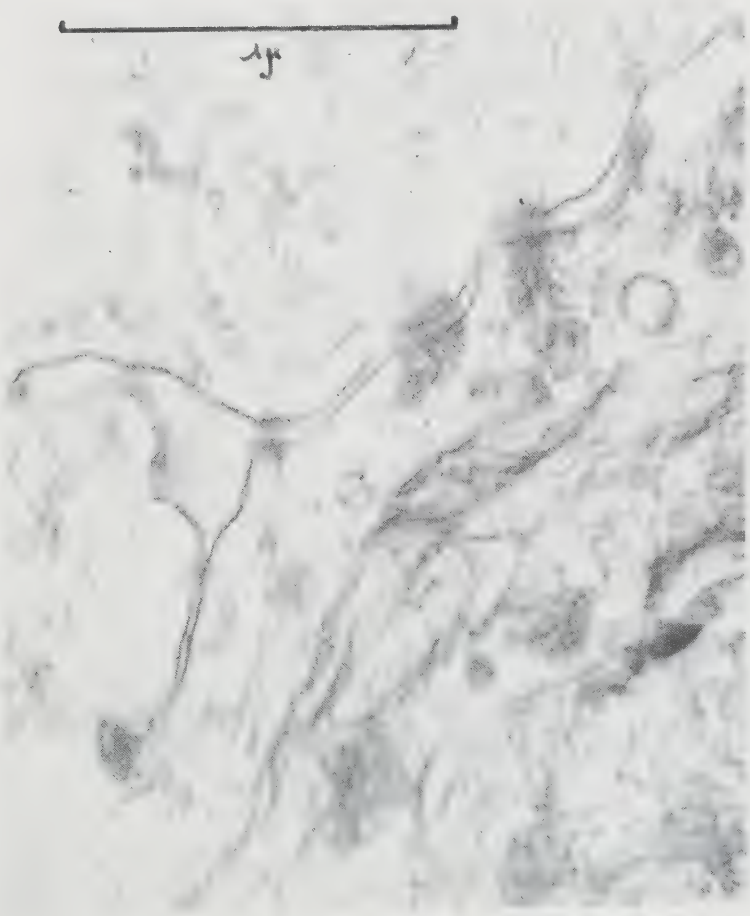


FIGURE 11

Aspect du culot C1 - (X 42.000) desmosomes de la membrane intercellulaire et fibres de kératine.

Il contient principalement des noyaux et des fibres de kératine mais également divers organites comme les mitochondries. Cette fraction est donc en fait trés hétérogène comme le confirme l'étude biochimique qui permet de déceler dans C1 des activités enzymatiques variées correspondant aux principaux types d'organites.

1-4 Nature du culot C2 (4.000 g - 10 minutes)

La nature des organites qui apparaissent sur les figures 12 et 13 est mitochondriale. On reconnaît, en effet, parfaitement sur ces clichés pris à différents grossissements des mitochondries non altérées avec double membrane .et crêtes internes. On reconnaît également dans cette fraction quelques organites correspondant à des formations microsomales et à des phagolysosomes à différents stades d'involution. Quelques mitochondries semblent être vidées de leur contenu. On remarque également, dispersées dans la préparation, de nombreuses microvillosités.

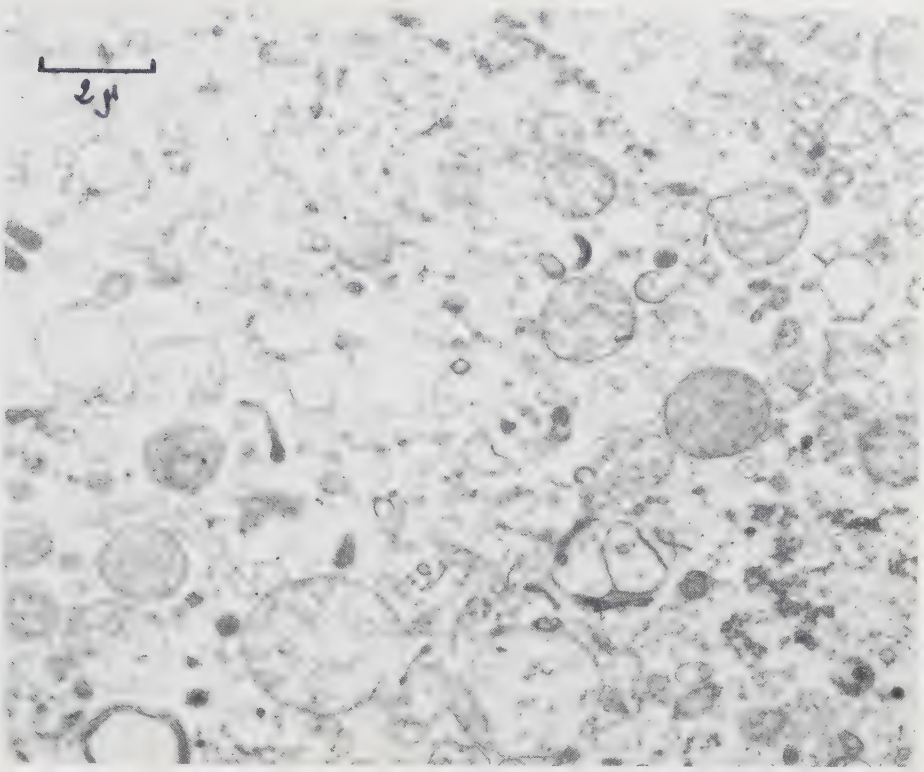
La faible teneur en acides ribonucléiques et lafaible activité des glucoses 6 Phosphatases indiquent que les formations microsomales ne sont pas trés contaminantes de cette fraction. La forte activité, totale et spécifique, des cytochromes oxydases confirme la nature des organites reconnaissables dans ce culot ; il s'agit incontestablement d'une fraction riche en mitochondries, fraction comparable à celle isolée par ROSETT et Coll. (94) chez le rat adulte.

1-5 Nature du culot C3 (40.000 g - 15 minutes)

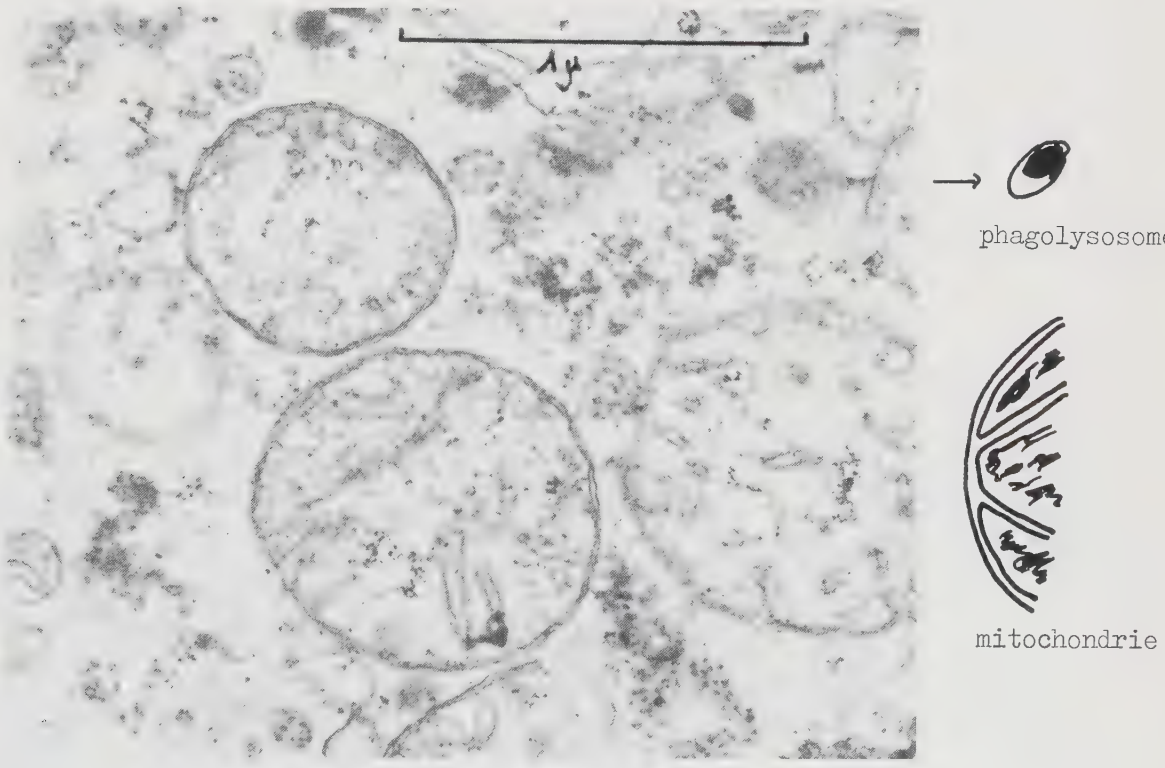
La figure 14 montre l'aspect du culot C3. On observe sur ce cliché de nombreux organites vides dont certains trés rares semblent correspondre à des mitochondries qui auraient subi quelques dommages au niveau de leurs membranes, de leurs crêtes et de leur matrice. En réalité, ces formations sont extrêmement rares comme l'atteste le peu d'activité des cytochromes oxydases.

On remarque surtout dans ce culot de nombreuses vésicules et corps multivésiculaires qui pourraient correspondre à des formations issues de la reconstitution de membranes à partir de 2 ou 3 fragments membranaires d'origine plasmique : reticulum endoplasmique, lysosomes, citernes de l'appareil de Golgi.

FIGURES 12 et 13 - ASPECT DU CULOT C2 (4.000 g - 10 minutes)



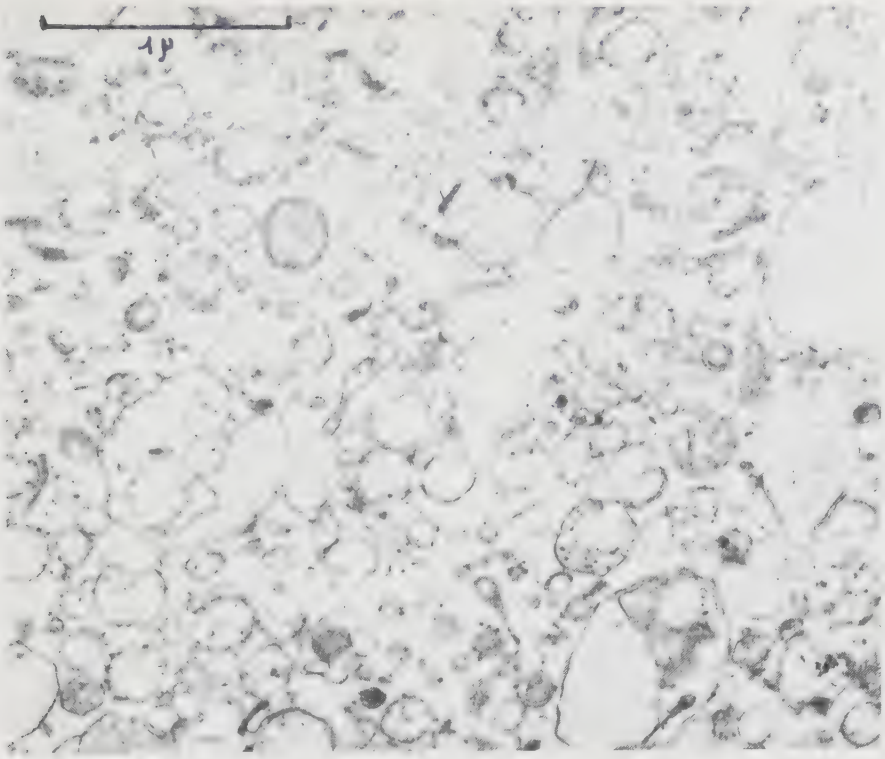
(X 7.200)



(X 54.000)

On reconnaît dans le culot C2 de nombreuses mitochondries non altérées avec double membrane et crêtes internes. L'activité cytochrome oxydase de cette fraction confirme la nature mitochondriale de ce culot.

FIGURE 14 - ASPECT DU CULOT C3 (40.000 g - 15 minutes)



(X 32.000)

→ Mitoch.altérée

vésicules et corps multivésicul.

lysosomes intacts ou altérés

L'observation du culot C3 montre que cette fraction correspond à des formations vésiculaires reconstituées à partir de membranes plasmiques. On observe également dans ce culot quelques lysosomes intacts ou altérés.

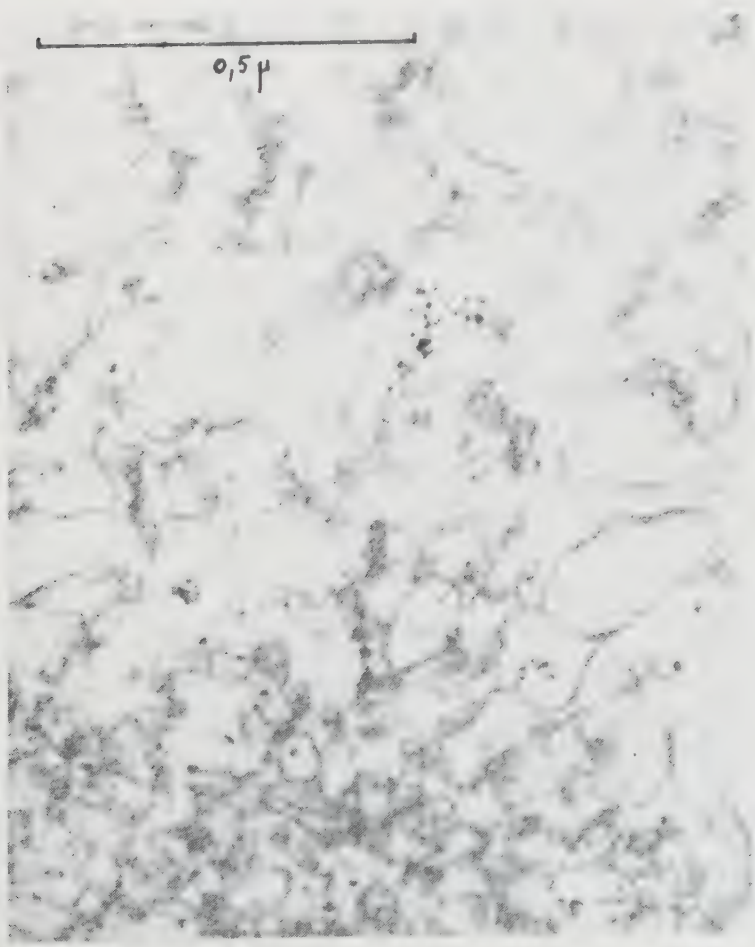


FIGURE 15

Fraction $\overrightarrow{2AG}$ (X 100.000)

→ on reconnaît dans cette fraction des débris membranaires parfois vraisemblablement réarrangés mais ne correspondant pas à des organites.

→ on observe également dans $\overrightarrow{2AG}$ quelques formations sombres de poids moléculaire élevé qui pourraient correspondre à des protéines non enzymatiques.

Enfin, on ne peut s'empêcher de rapprocher ces images de celles publiées par BEAUFAY (101), MOTTAZ et Coll. (102) ; ces derniers mettent en évidence dans les kératinocytes de nombreuses vacuoles dont le contenu est dégradé ; ces vacuoles résulteraient de l'involution des lysosomes après strippings.

L'activité spécifique des glucoses 6 phosphatases confirme l'origine membranaire endoplasmique des corps vésiculaires. De même, l'activité spécifique des β glycérophosphatases montre que certaines de ces formations sont des lysosomes intacts ou ayant subi des altérations (Figure 7). Si l'on considère les activités totales des β glycérophosphatases et des glucoses 6 phosphatases, on remarque qu'en fait la fraction C3 ne détient pas la majeure partie de ces enzymes (Figure 6) celles-ci doivent donc se trouver dans les culots ultérieurs. Cependant, le fait que l'activité spécifique de ces 2 enzymes soit assez élevée montre que les protéines contenues dans C3 sont surtout de nature enzymatique.

En résumé, le culot C3 correspond à des formations vésiculaires reconstituées à partir de membranes dont l'origine peut être variée ; nous dirons que C3 est constitué par les "membranes plasmiques" et quelques lysosomes intacts ou involués.

1-6 Nature de la fraction 2AG (Figure 15)

On peut observer dans cette zone du gradient des débris membranaires sans doute réarrangés mais sans organisation particulière qui permettrait d'identifier ces structures à des organites. L'origine de ces membranes peut être différente ; ceci explique que l'on trouve une activité β glycérophosphatasique, glucose 6 phosphatasique et même une activité cytochrome oxydasique dans cette zone du gradient. Le fait de trouver une activité enzymatique caractéristique des mitochondries dans cette zone du gradient provient du fait que certains de ces organites ont été altérés au cours des manipulations et on décèle ainsi dans les zones de plus forte densité du gradient, les vestiges des membranes internes mitochondriales qui supportent les cytochromes oxydases.
On reconnaît également dans cette zone du gradient quelques formations correspondant à des protéines de poids moléculaire élevé, telles les histones, par exemple. La présence de protéines non enzymatiques à ce niveau peut expliquer la faible activité spécifique des enzymes de cette fraction.

1-7 Nature des fractions $\overset{\circ}{I}\vec{G}$ et $1A\vec{G}$ (Figures 16 et 17)

L'aspect des culots obtenus à partir du premier anneau et de la phase intermédiaire du gradient est identique. On observe sur les clichés (figures 16 et 17) une multitude de petits grains disposés parfois en forme de chapelet. Ces images sont caractéristiques des ribosomes et les alignements de ces organites correspondent à des formations de polysomes.

La présence de ribosomes en $I\vec{G}$, $1A\vec{G}$ est confirmée par le pic d'activité des glucoses 6 phosphatases et la teneur en acides ribonucléiques dans chacune de ces 2 fractions.

L'activité des β glycérophosphatases qui se manifeste dans la fraction $1A\vec{G}$ ne peut s'expliquer que par une diffusion des enzymes solubles du surnageant dans cette zone proche de $S\vec{G}$. Ceci n'est pas particulier aux β glycérophosphatases. Comme nous le verrons plus loin, (cf paragraphe 2-1) nous avons mis en évidence une diffusion des produits solubles dans le surnageant le long du gradient. Ainsi, les enzymes non liées aux organites, l'A.R.N., les protéines solubles etc .... diffusent dans le premier anneau du gradient pendant l'ultracentrifugation.

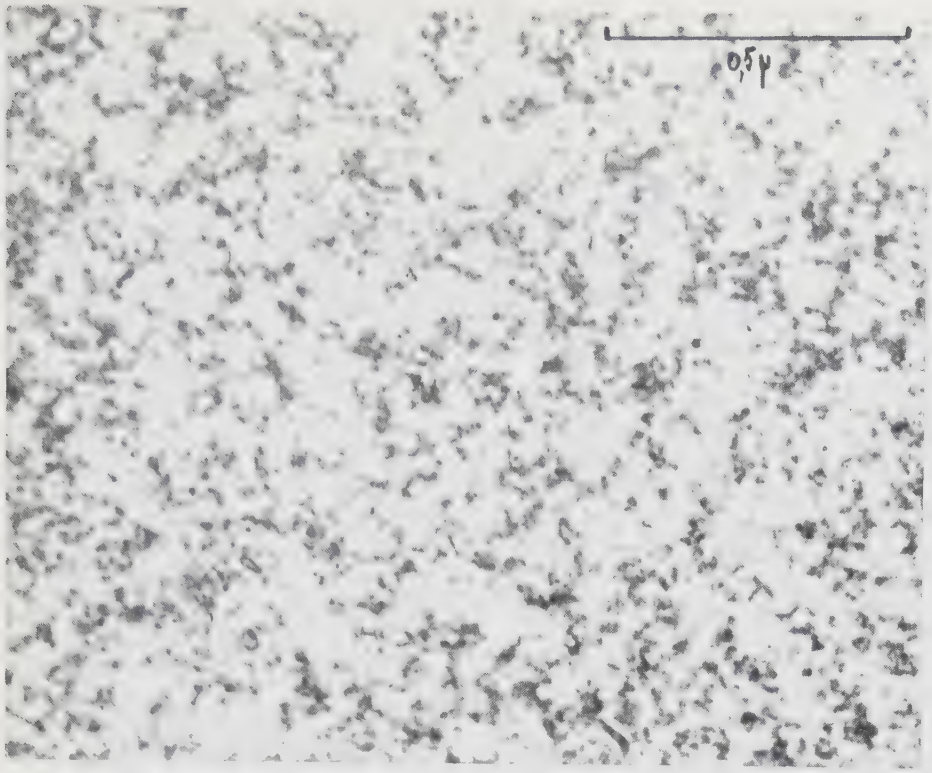
La diffusion de protéines dont la nature n'est pas forcément enzymatique vers le premier anneau du gradient, a pour effet d'abaisser, comme on peut le constater sur le tableau III et les figures 6 et 7, l'activité spécifique des enzymes étudiées. C'est ainsi que l'activité spécifique des glucoses 6 phosphatases se trouve diminuée dans la fraction $1A\vec{G}$ par rapport à la fraction $I\vec{G}$ alors que leurs activités totales étaient identiques.

1-8 Nature de la fraction $S\vec{G}$

Il peut paraître surprenant de trouver dans le surnageant du gradient une fraction par la suite sédimentable. En fait, $S\vec{G}$ correspond à une solution de densité 1,040 et les particules qui possèdent ce rapport poids-volume se sont normalement localisées à ce niveau pendant l'ultracentrifugation.

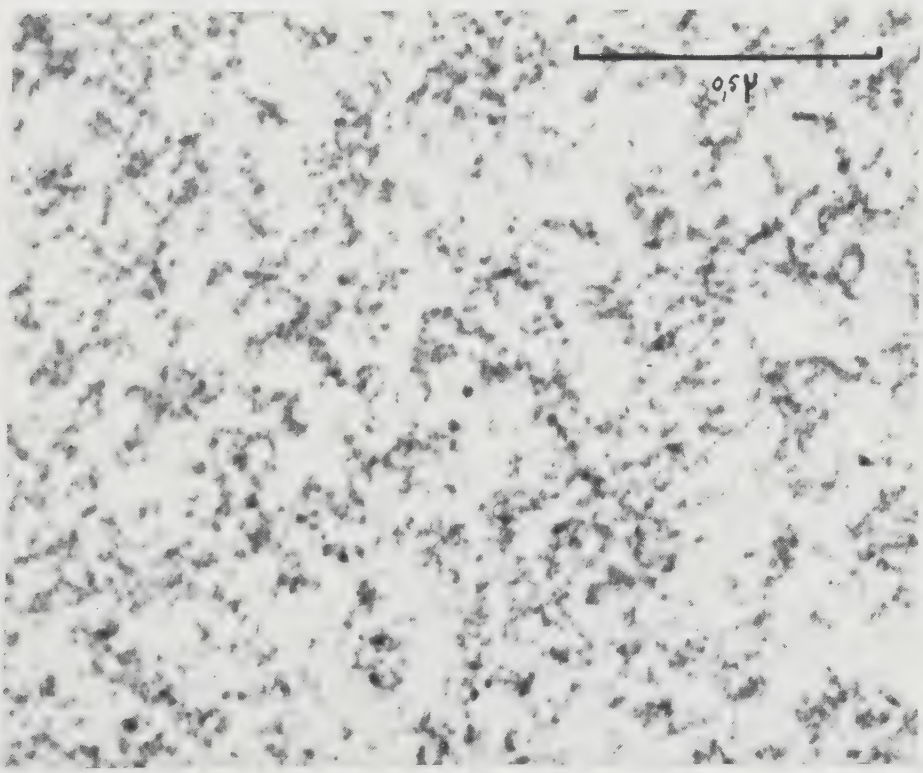
D'autre part, avant d'aborder l'étude biochimique de la fraction $S\vec{G}$ il convient de noter que les acides ribonucléiques dosés dans cette fraction ne correspondent qu'aux A.R.N. sédimentables de $S\vec{G}$.

FIGURE 16 : FRACTION INTERMEDIAIRE DU GRADIENT ($I\vec{G}$)



(X 80.000)

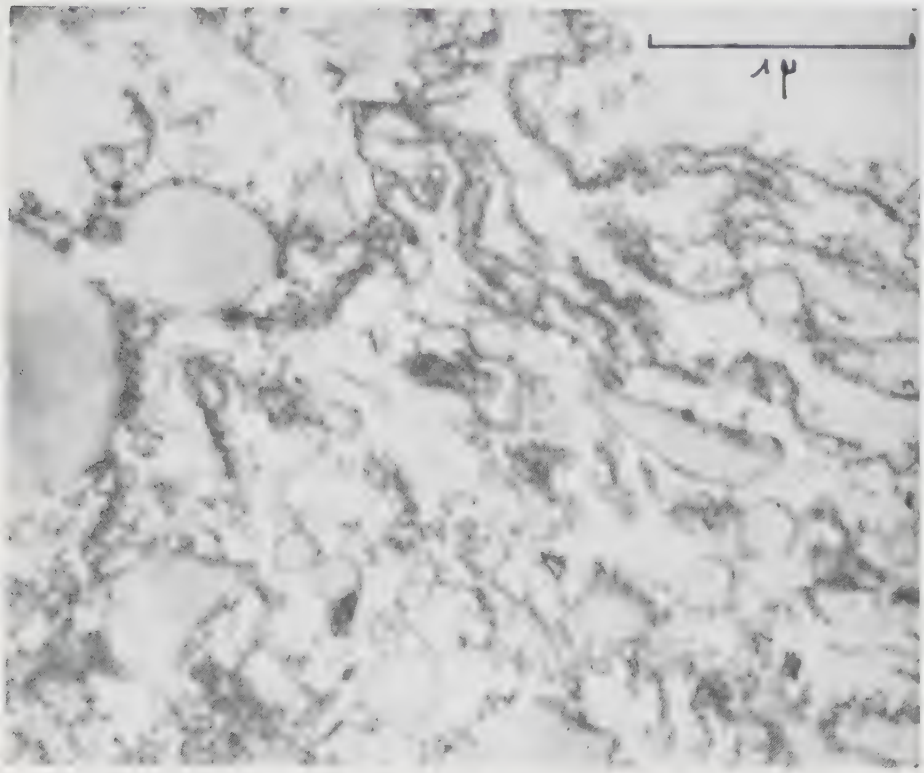
FIGURE 17 : PREMIER ANNEAU DU GRADIENT ($1\vec{A}G$)



(X 80.000)

L'aspect des culots obtenus à partir du premier anneau et de la phase intermédiaire du gradient est identique : on observe sur les clichés une multitude de petits grains disposés parfois en forme de chapelet. Ces images sont caractéristiques des ribosomes et les alignements de ces organites correspondent à des formations de polysomes.

FIGURE 18 : FRACTION SEDIMENTABLE DU SURNAGEANT DU GRADIENT



(X 35.000)

Globules lipidiques

Membranes créées vraisemblablement artificiellement par réarrangement de phospholipides et de lipoprotéines.

On aperçoit sur ce cliché de nombreuses formations grises et rondes qui correspondent à des globules lipidiques. On observe également tout un réseau formé semble-t-il par des phospholipides et des lipoprotéines qui vraisemblablement par réarrangement moléculaire pourrait avoir créé un système de membranes artificielles.

Les A.R.N. solubles que l'on s'attend normalement à retrouver dans cette fraction n'ont pu être déterminés par la méthode de MOULE puisque ce dosage doit se dérouler en absence totale de saccharose.

On ne reconnaît pas dans la fraction sédimentable de S $\vec{G}$ (figure 18) de lysosomes qui pourraient rendre compte de l'activité des phosphatases acides déterminée dans cette zone du gradient. En fait, l'activité des /3glycérophosphatases trouvées dans S $\vec{G}$ ne correspond pas à une activité liée à des organites mais à une activité libre du surnageant. D'une manière générale, le peu de lysosomes identifiés, d'une part dans la peau entière et d'autre part dans les différents culots ne rend pas compte de l'activité enzymatique importante des phosphatases acides. Selon DICKEN et DECKER (74), l'activité enzymatique lysosomale est liée à la matrice de l'organite mais BRANDES et BERTINI (103) dans leur étude sur le rôle des lysosomes dans le processus de kératinisation font bien observer que dans les cellules désintégrées l'activité phosphatasique ne reste pas longtemps associée aux lysosomes mais diffuse rapidement dans le cytoplasme de la cellule. Il n'est donc pas surprenant de constater que le surnageant manifeste une activité /3glycérophosphatasique dont ne rend pas compte le nombre de lysosomes reconnus dans les différentes fractions.

L'observation d'une photographie de la fraction sédimentable du surnageant du gradient (figure 18) montre en fait de nombreuses formations grises et rondes d'un diamètre égal ou inférieur au micron qui correspondent à des globules lipidiques. On observe également tout un réseau formé semble-t-il par des phospholipides et des lipoprotéines qui vraisemblablement par réarrangement moléculaire pourrait avoir créé un système de membranes artificielles.

1-9 Conclusion

L'association des critères biochimiques et morphologiques permet d'identifier à peu près correctement les organites qui caractérisent les culots de sédimentation et les zones du gradient. La technique employée pour fractionner les constituants cellulaires est très imparfaite et n'a pas permis d'obtenir dans tous les cas des fractions subcellulaires absolument débarrassées de contaminants.

Cependant, certaines formations dominent trés largement dans certains culots et il est possible de proposer la généralisation suivante :

- le culot C1 correspond à la fraction nucléaire
- le culot C2 correspond à la fraction mitochondriale
- le culot C3 correspond à un système vésiculaire d'origine membranaire et à quelques rares lysosomes
- la fraction $2\vec{AG}$ correspond également à des membranes plasmiques
- les fractions $I\vec{G}$ et $1\vec{AG}$ correspondent aux ribosomes
- la fraction sédimentable de $S\vec{G}$ correspond à des membranes artificielles constituées à partir de phospholipides et de lipoprotéines.

L'aspect bien connu des microsomes après désintégration de la cellule n'a pas été ici entièrement conservé après homogénéisation et ultracentrifugation de l'épiderme. Il y a eu dissociation de la fraction microsomale ; on retrouve dans le culot C3 les membranes et dans les fractions $I\vec{G}$ et $1\vec{AG}$ les ribosomes.

2) RECHERCHE DES METABOLITES ^{14}C DU BTE AU NIVEAU DES ORGANITES EPIDERMIQUES ISOLES PAR ULTRACENTRIFUGATION

2-1 Expérience préliminaire : diffusion de produits solubles le long du gradient

Si on dépose au sommet d'un gradient tel que nous l'avons défini une quantité déterminée de chlorhydrate de BTE 1,2 ^{14}C et que l'on mesure la répartition de la radioactivité le long du gradient, on remarque que 12 % ont diffusé dans la zone correspondant à $1\vec{AG}$; 1,5 % dans la zone correspondant à $I\vec{G}$ et 2,5 % dans la zone correspondant à $2\vec{AG}$. Il y aura donc lieu dans tous les calculs de corriger le nombre de dpm trouvés au niveau de chaque zone du gradient en fonction de la contamination établie.

2-2 Résultats et discussion

Le tableau IV fait état du nombre de dpm trouvés (compte-tenu des dilutions, des prises d'essai et de la remarque faite ci-dessus à propos de la diffusion le long du gradient) dans C1 - C2 - C3 - $2\vec{AG}$ - $I\vec{G}$ - $1\vec{AG}$ - $S\vec{G}$. L'activité spécifique correspond au nombre de dpm par mg de protéines

	Activité Totale (Dpm)	%		Act. Spécifique (Dpm/mg Protéines)	%
∘ C1	6.350	6,30		250	7,80
∘ C2	248	0,25		106	3,40
∘ C3	580	0,60		255	8
• 2AG	520	0,50	0,5	40	1,30
∘ I G	2.335	2,30	2,5	330	10,30
∘ 1AG	4.728	4,75	5	320	10
∘ SG	86.310	85,40	92	1.885	59,30

- RECHERCHE DES METABOLITES ^{14}C DE LA BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE AU NIVEAU DES ORGANITES EPIDERMIQUES DU RAT ISOLES PAR ULTRACENTRIFUGATION -

(% = Pourcentage d'activité dans chaque fraction par rapport à l'activité de toutes les fractions)

TABLEAU IV

Les pourcentages des activités totale et spécifique de chaque fraction par rapport aux pourcentages des activités totales et spécifiques de toutes les fractions figurent également dans ce tableau.
Enfin, ces résultats ont été reportés sur les figures 6 et 7 qui rendent compte de l'état biochimique de chaque culot et de chaque fraction du gradient. (Voir pages 156 et 157).

L'activité contenue dans le surnageant du gradient correspond à l'activité du pic de sortie comprise entre 120 et 240 ml après passage sur colonne de "Sephadex" du surnageant S3. (Métabolites ^{14}C du BTE non liés aux organites). Par contre, l'activité qui sort avec le volume mort de la colonne entre 60 et 100 ml correspond à une activité liée aux organites contenus dans le reste du gradient.

On trouve une bonne corrélation dans la mesure de l'activité liée ou libre en comparant les deux méthodes . En effet, on a pu calculer après passage sur colonne de "Sephadex" que les métabolites liés aux organites contenus dans S3 représentent 10,2 % de l'activité et les métabolites non liés 89,8 % (voir à la page 153). Après ultracentrifugation du surnageant S3 déposé sur le gradient de sucrose on trouve 8 % de métabolites liés aux fractions $2A\vec{G}$, $I\vec{G}$, $1A\vec{G}$ et 92 % de métabolites non liés solubles dans le surnageant final du gradient ($S\vec{G}$).

Ainsi, une large proportion de métabolites ^{14}C du BTE se retrouvent non liés dans le surnageant ; en ce qui concerne les métabolites liés aux organites, on constate que ce sont les culots C1 et C3 et les zones du gradient $1A\vec{G}$ et $I\vec{G}$ qui détiennent l'activité.
Il est difficile de préciser la nature du support des métabolites du culot C1 car nous avons pu voir combien cette fraction était hétérogène. Par contre, comme déjà le passage de S3 et S4 sur colonne de "Sephadex" le laissait entrevoir, l'activité est importante dans les organites de haute constante de sédimentation : les ribosomes (premier anneau et phase intermédiaire du gradient). Les membranes du culot C3 sont également actives. Ainsi, au niveau des organites subcellulaires de l'épiderme du rat, l'activité se trouve donc liée en fait à la fraction microsomale dissociée.

Nous avons vu dans la seconde partie de ce travail que la phosphatidate phosphatase, enzyme impliquée dans l'inhibition de la synthèse des triglycérides par certains dérivés soufrés, est localisée précisément au niveau des microsomes (54) (59) (60) (61) (62) (63) (64) où se déroulent certaines étapes de la biosynthèse des lipides neutres. Ainsi, l'enzyme et les métabolites du BTE responsables de l'inhibition de l'incorporation d'acide oléique $10^{-14}C$ dans les triglycérides se trouvent bien en contact dans cette fraction. C'est à ce niveau que se formerait le complexe enzyme-substrat-inhibiteur mis en évidence dans la seconde partie.

CONCLUSIONS GENERALES

Dans ce travail, nous avons étudié le mécanisme d'action de quelques dérivés soufrés sur le métabolisme lipidique cutané du rat.

L'étude de l'incorporation d'acide oléique 10 ^{14}C dans les lipides neutres et les phospholipides cutanés chez des rats nourris normalement, des rats à jeun, des rats carencés en biotine - tous ces animaux étant traités ou non in vivo puis in vitro avec des dérivés cystéaminiques ou cystéiniques - a permis de mettre en évidence sur le plan biochimique cutané :

- une augmentation de la synthèse des triglycérides in vitro après une période de jeûne et ce indépendamment du traitement. Ce phénomène est contraire à celui que l'on observe normalement au niveau du tissu adipeux. Ceci suggère que le jeûne pourrait avoir un effet spécifique sur les lipides épidermiques et sébacés.

- une inhibition nette de la synthèse des triglycérides in vitro après une période de jeûne chez les animaux traités avec différents sels de la benzyl thio -2-éthylamine (BTE). Cette inhibition semble compensée par une déviation vers une synthèse accrue de certains phospholipides comme les phosphatidylsérines, phosphatidyléthanolamines, phosphatidylcholines. Le taux d'incorporation d'acide oléique dans les acides phosphatidiques n'est pas modifié par le BTE.

- l'avant dernière étape de la biosynthèse des triglycérides consistant en une déphosphorylation des acides phosphatidiques, l'inhibition de la phosphatidate phosphatase, enzyme impliquée dans cette déphosphorylation peut expliquer la diminution d'incorporation d'acide oléique dans les triglycérides sous l'effet du BTE. Dans ces conditions, le fait d'observer parallèlement une augmentation d'incorporation dans certains phospholipides entraîne que l'anabolisme de ceux-ci doit s'effectuer préférentiellement par une voie qui ne fait pas intervenir de déphosphorylation préalable des acides phosphatidiques.

- ce "système expérimental" n'a pas permis de mettre en évidence le mode d'action des dérivés cystéiniques comme agents correcteurs d'un excès de sébum. Leur mécanisme d'action serait donc différent et nos constatations n'excluent pas les propriétés qui ont été attribuées à ce type de molécules.

L'étude cinétique de l'activité des phosphatases acides épidermiques a confirmé que la diminution de synthèse des triglycérides sous l'effet des sels de BTE pouvait effectivement s'expliquer par une inhibition de la phosphatidate phosphatase.

L'inhibition est de type non compétitif absolu. Il n'existe donc aucune action directe des molécules inhibitrices sur le substrat mais une fixation de certains dérivés sur les phosphatases acides. Cette fixation se fait indépendamment de la formation du complexe enzyme-substrat. Sur les phosphatases acides engagées dans de telles réactions il existe au moins deux sites de fixation bien distincts : un sur lequel va se lier l'acide phosphatidique et un autre où l'inhibiteur doit également pouvoir se fixer. La formation de ce complexe est irréversible et ainsi il y a inhibition par certaines molécules soufrées de la réaction déphosphorylante du substrat catalysée par les phosphatases.

L'étude comparative de quelques 60 molécules soufrées qui diffèrent par une ou plusieurs substitutions le long de leur édifice moléculaire a permis d'établir des relations entre la structure et l'activité des molécules :

Ainsi, l'étude du coefficient d'inhibition (le Ki) de ces molécules vis à vis des phosphatases acides a montré que le radical benzyle n'est pas absolument nécessaire à l'activité antiphosphatasique, il peut être substitué par tout autre noyau ou radical comportant une double liaison ou une chaîne ramifiée : en règle générale, par tout groupement donneur d'électrons. Les constantes d'inhibition sont meilleures avec l'atome de soufre qu'avec l'atome d'oxygène ; ceci justifie l'emploi préférentiel des dérivés du soufre dans ces molécules. La fonction amine semble jouer un rôle capital dans l'activité de ces molécules ; en effet, toute perte ou affaiblissement de la basicité des molécules (cas des dérivés cystéiniques) entraînent une annulation de l'effet inhibiteur. Le doublet libre de l'amine pourrait donc servir à l'établissement d'une liaison entre l'enzyme et l'inhibiteur déterminant ainsi le site actif de la liaison.

L'étude du renouvellement de la ^{35}S carboxyméthylcystéine (CMC ^{35}S) et du chlorhydrate de ^{35}S ou 1,2 ^{14}C benzyl thio-2-éthylamine (BTE ^{35}S ou 1,2 ^{14}C) a apporté quelques renseignements que l'on peut ainsi interpréter :

- le comportement de l'organisme vis à vis de molécules soufrées cystéiniques et cystéaminiques est différent. La CMC n'est pas entièrement métabolisée et on la retrouve intacte à 40 % dans les mictions alors que le BTE est entièrement scindé.

- l'élimination par les voies urinaires est prédominante pour les deux types de molécules (de l'ordre de 70 %). Ceci ne signifie pas que la cinétique d'élimination des métabolites soit identique : en effet, les métabolites contenant le groupement éthylamine sont éliminés beaucoup plus rapidement que les métabolites soufrés. Parallèlement à ce que l'on observe dans l'urine, on décèle au niveau sérique une chute d'activité moins rapide avec les métabolites ^{35}S qu'avec les métabolites ^{14}C.

- les produits injectés sont relativement rapidement épurés du sang par les reins. Les métabolites apparaissent tous en même temps dans les urines et dans des proportions toujours identiques tout au long de l'expérience ; ceux qui détiennent l'atome du soufre, et le radical benzyle dans le cas du BTE, ne semblent pas contenir la fonction amine. Ce résultat suggère que la molécule est coupée entre l'atome de soufre et la fonction amine. Enfin, les produits injectés ou leurs métabolites ne sont pas réabsorbés au niveau tubulaire rénal pour réutilisation.

- la CMC ou ses métabolites ^{35}S se retrouvent dans la peau après injection intrapéritonéale avec une localisation préférentielle dans l'épiderme. L'activité se maintient plusieurs heures. Cette mesure est corroborée par l'observation des tissus en autohistoradiographie : les zones kératogènes ainsi que la matrice du poil sont actives. Bien que nous n'ayons pu expliquer par l'inhibition de la synthèse des lipides neutres le mode d'action des dérivés cystéiniques, l'activité de la CMC ou de ses métabolites ^{35}S mesurée dans l'épiderme supporte les propriétés d'agents correcteurs d'un excès de sébum qui leur ont été attribuées.

- Après injection de BTE ^{35}S on ne retrouve au niveau cutané qu'un très faible pourcentage d'incorporation. Par contre, après injection de la même molécule mais 1,2 ^{14}C on retrouve dans l'épiderme 40 fois plus d'activité qu'après injection de BTE ^{35}S. Ce résultat précise que la molécule est coupée entre le soufre et les carbones adjacents à la fonction amine et qu'en fait, c'est "la partie éthanolamine" de la molécule qui est retenue au niveau cutané et qui s'incorpore dans les zones kératogènes, les gaines du poil et les glandes sébacées comme le démontre des autohistoradiographies. Ce résultat confirme l'importance de la fonction amine, importance déjà soulignée au cours de la seconde partie.

- Malgré ces observations il est quand même curieux de constater que la thio 2 éthylamine est prosébogène, que l'éthylamine est sans action sur l'activité des phosphatases acides, que la molécule doit posséder pour être active un radical donneur d'électrons, que la forme benzyl oxy est moins inhibitrice vis à vis des phosphatases acides que la forme benzyl thio. Pour manifester les propriétés que nous leur avons reconnu les dérivés soufrés doivent donc être administrés tel qu'il a été défini plus haut, certains atomes groupements ou radicaux potentialisant vraisemblablement la coupure de la molécule avant que l'organisme puisse tirer partie de certains métabolites pour corriger par exemple, comme dans le cas qui nous préoccupe, un excès de sébum.

Où in situ et à l'échelle cellulaire se déroulent les mécanismes d'action mis en évidence ? Pour répondre à cette question nous avons dû mettre au point une technique d'extraction d'organites subcellulaires par ultracentrifugation sur gradient de saccharose d'un homogenat d'épiderme.

L'étude morphologique - observation du matériel extrait au microscope électronique - ainsi que la détermination dans les fractions isolées d'enzymes spécifiques a montré que les séparations ne sont pas parfaites et restent criticables. Cependant, certaines formations dominent très largement dans certains culots et il a été possible de proposer la généralisation suivante :

- Le culot C_1 correspond à la fraction nucléaire.
- Le culot C_2 correspond à la fraction mitochondriale.
- Le culot C_3 correspond à des membranes et à quelques rares lysosomes.
- La fraction $2\vec{AG}$ correspond également à des membranes plasmiques.
- Les fractions $\vec{IG}$ et $1\vec{AG}$ correspondent aux ribosomes.
- La fraction sédimentable de $\vec{SG}$ correspond à des membranes artificielles (phospholipides et lipoprotéines).

L'aspect bien connu des microsomes après désintégration de la cellule n'est pas conservé au cours de cette extraction ; on retrouve en C_3 les membranes et en $1\vec{AG}$ et $\vec{IG}$ les ribosomes. D'autre part, le peu de lysosomes rencontrés dans les fractions ne rend pas compte de la forte activité βglycérophosphatasique de l'épiderme ; cette enzyme est libre dans le surnageant.

Après injection intrapéritonéale de chlorhydrate de BTE 1,2 ^{14}C chez le rat l'étude de l'activité après passage sur colonne de Séphadex montre que 10 % des métabolites ^{14}C du BTE retrouvés au niveau de l'épiderme sont liés à des organites de haute constante de sédimentation. L'étude de la répartition de l'activité au niveau des organites isolés montre qu'en fait ces 10 % se trouvent liés aux membranes de C_3 et aux ribosomes de $1\vec{AG}$ et $\vec{IG}$ soit donc au niveau de la fraction microsomale dissociée. Le reste de l'activité se trouve lié à des peptides solubles dans le surnageant.

La phosphatidate phosphatase, enzyme impliquée dans l'inhibition de la synthèse des triglycérides par certains dérivés soufrés est localisée précisément au niveau des microsomes où se déroulent certaines étapes de la biogénèse des lipides neutres. Ainsi, l'enzyme et les métabolites du BTE responsables de l'inhibition de l'incorporation d'acide oléique 10 ^{14}C dans les triglycérides se trouveraient bien en contact dans cette fraction. Dans l'épiderme, au niveau des microsomes pourraient donc se dérouler les réactions d'inhibition et de régulation de la lipogénèse que nous venons de développer tout au long de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE ET TABLE DES MATIERES

BIBLIOGRAPHIE

(1) - ARLOING (S)
Arc.phys.norm.path ; 3, 1891, 160.

(2) - HERXHEIMER (A)
Ed.W.Montagna-Pergamon Press ; 1960, 63.

(3) - KORTING (GW)
XIIIè.congrès international de dermatologie ; 1, 1968, 623.

(4) - WEDDEL (G)
Ed.W.Montagna-Pergamon Press ; 1961, 71.

(5) - FOX (RH) - HILTON (SM)
J.Physiol GB ; 142, 1958, 219.

(6) - MOLLER (H)
Acta.Dermato-Venereol. ; 44 (suppl.55), 1964, 1.

(7) - ZACHKHEIM (M)
J.Invest.Dermatol ; 50 (1), 1968, 401.

(8) - POCHI (PE) - STRAUSS (JS)
J.Invest.Dermatol ; 52 (1), 1969, 32.

(9) - JULESZ (M)
Acta Med.Acad.Sci.Hungar ; 25, 1968, 273.

(10) - EBLING (FJ) (E) - SKINNER (J)
J.Endocrinol ; 45, 1969, 245.

(11) - MAGGIORA (A) - REIFFERS (J) - BUJARD (E) - JABASSON (W)
Experientia ; 24, 1968, 1262.

(12) - WEINSTEIN (GD) - FROST (P) - HSIA (SL)
J.Invest.Dermatol ; 51 (1), 1968, 4.

(13) - SANSONE BAZZANO (G) - REISNER (RM)
First joint meeting ; SID ; E.S.D.R. Amsterdam 1972.

(14) - RONGONE (EL)
Proc.Soc.Exp.Biol.Med ; 130 (1), 1969, 153.

(15) - LADEN (K)
Americ.Parf.Cosm ; 83 (3), 1968, 47.

(16) - EBLING (FJ) (E) - SKINNER (J)
J.Endocrinol ; 45, 1969, 257.

(17) - SUZUKI (S)
J.Derm.Wool ; 40, 1936, 203.

(18) - MONTGOMERY (DW)
Skin diseases nutrition and metabolism. Ed.Grune and Stratton ; 1947, 41.

(19) - KELLUM (RE)
Arc.Dermatol ; 97, 1968, 722.

(20) - TERROINE (T)
Arch.Sc.Physiol ; 8, 1954, 61.

(21) - ELDJARN (L) - PIHL (A)
J.Biol.Chem ; 226, 1957, 497.

(22) - SKREDE (S) - CHRISTOPHERSEN (BO)
Biochem.J ; 37, 1966, 101.

(23) - FOLCH (J) - LEES (N) - SLOANNE STANTLEY (BN)
J.Biol.Chem ; 226, 1957, 497.

(24) - MARINETTI (GU) - ERBLAND (J) - KOCHEM (J)
Feder.Proc ; 16, 1957, 837.

(25) - POSTERNAK (N)
Helv.Chim.Acta ; 18, 1957, 1351.

(26) - BARRON (EJ) - HANAHAN (DJ)
J.Biochem ; 231, 1958, 493.

(27) - PAYSANT DIAMENT (M) - POLONOVSKI (J)
Bull.Soc.Chim.Biol.Fr ; 42, 1960, 337.

(28) - SOULA (G) - DOUSTE BLAZY (L) - VALDIGUIE (PP)
Ann.Biol.Clin ; 21, 1963, 597.

(29) - SINGH (EJ) - GERSHBEIN (LL)
J.Chromatogr ; 31, 1967, 20.

(30) - COULON MORELEC (NJ) - FAURE (N) - MARECHAL (J)
Bull.Soc.Chim.Biol.Fr ; 42, 1960, 867.

(31) - ULLBERG (S)
Second.U.N inter.conf.peaceful uses of atomic energy ; 24, 1958, 248.

(32) - ULLBERG (S)
Biochem.Pharmacol ; 9, 1962, 29.

(33) - BOYD (GA)
N.Y.Acad.Press ; 1955.

(34) - PELLERIN
C-R.Acad.Sci ; 244, 1957, 1955.

(35) - ZADJELLA (F)
Tech.lab.Masson et Cie ; 2, 1962, 545.

(36) - KALOPISSIS (G)
Brevets France - Société L'Oréal - France
1.505.874 1.560.250
1.472.021 2.002.461

(37) - NICOLAIDES (N) - FU (HC) - RICE (GR)
J.Invest.Dermatol ; 51, 1968, 83.

(38) - SOLYOM (A) - PUGLISI (L)
Biochem.Pharmacol ; 15, 1966, 41.

(39) - SHAPIRO (B) - CHOWERS (I) - ROSE (G)
Biochim.Biophys.Acta ; 23, 1957, 115.

(40) - ROSE (G) - SHAPIRO (B)
Biochim.Biophys.Acta ; 18, 1966, 504.

(41) - NICOLAIDES (N)
Ed.Montagna, Ellis. R.A Silver, Vol 4 Pergamon press.; 1963.

(42) - NICOLAIDES (N)
J.Amer.oil.Chemist's Soc ; 42, 1965, 708.

(43) - DUPONT (J) - ATKINSON (KS) - SMITH (L)
Steroïds 10/1/1967.

(44) - ZIBOH (UA) . HSIA (SL)
Arch.Biochem.Biophys ; 131 (1), 1969, 153.

(45) - BULLOUGH (WS) - LAURENCE (EB)
Proc.R.Soc.Med ; 154, 1961, 540.

(46) - PERSHAN (PS) - SHULMAN (RG) - WYLUDA (BJ) - ELSINGER (J)
Physics ; 1, 1964, 163.

(47) - ELDJARN (L) - PIHL (A)
Pharmacol.Rev ; 10, 1958, 437.

(48) - ZARUBA (F) - KARASEK (MA) - FARBER (EM)
J.Invest.Dermatol ; 49 (5), 1967, 537.

(49) - COLEMAN (R) - HUESCHER (G)
Biochem.J ; 80, 1961, 128.

(50) - KENNEDY (EP)
Annu.Rev.Biochem ; 26, 1957, 119.

(51) - PAULUS (H) - KENNEDY (EP)
J.Biol.Chem ; 235, 1960, 1303.

(52) - HOKIN (LE) - HOKIN (MR)
J.Biol.Chem ; 233, 1958, 800.

(53) - HUBSCHER (G) - CLARK (B)
Biochim.Biophys.Acta ; 41, 1960, 45.

(54) - SMITH (SW) - WEISS (SB) - KENNEDY (EP)
J.Biol.Chem ; 228, 1957, 915.

(55) - ROSSITER (RJ) - STRICKLAND (KP)
Ann.New-York Acad.Sci. ; 72, 1959, 790.

(56) - HOKIN (LE) - HOKIN (MR)
Nature ; 184, 1959, 1068.

(57) - JOHNSTON (JN) - BEARDEN (JH)
Biochim.Biophys.Acta ; 56, 1962, 365.

(58) - POMAZANSKAYA (LF)
Evolyutisionni biokhim i fiziol ; 1 (4), 1965, 320.

(59) - HOKIN (MR) - HOKIN (LE)
J.Biol.Chem ; 234 (6), 1959, 1381.

(60) - HOKIN (MR) - HOKIN (LE)
Lab.invest ; 10, 1961, 1151.

(61) - JOHNSTON (JN) - RAO (GA) - LOWE (PA) - SCHWARTZ (BE)
Lipids ; 2 (1), 1967, 14.

(62) - POMAZANSKAYA (LF)
Dokl.acad.Nauk.S.S.S.R ; 155 (1), 1964, 208.

(63) - HIRANO (C) - GILBERT (I)
J.insect

(64) - SMITH (ME) - SEDGWICK (B) - BRINDLEY (DN) - HUBSCHER (G)
Europ.J.Biochem ; 3 (1), 1967, 70.

(65) - STOFFEL (W) - SCHIFFER (HG)
(H.opp.Seyler's)z. Physiol.Chem ; 349 (8), 1968, 1017.

(66) - WILGRAM (GF) - KENNEDY (EP)
J.Biol.Chem ; 232 (2), 1963, 615.

(67) - RONCARI (DAK) - HOLLENBERG (GH)
Biochim.Biophys.Acta ; 137, 1967, 446.

(68) - SEDWICK (B) - HUBSCHER
Biochim.Biophys.Acta ; 106, 1965, 63.

(69) - ROSENTHAL (AF) - HSIEN HAN (SC)
Biochim.Biophys.Acta ; 152, 1968, 96.

(70) - MARGOLIS (S) - VAUGHAN (M)
J.Biol.Chem ; 237, 1962, 44.

(71) - ROSE (G) - SHAPIRO (R)
Bull.Res.Counc.Israël.sect A et E ; 15, 1960.

(72) - VAUGHAN (M)
J.lipid.Res ; 2, 1961, 293.

(73) - BRANDES (R) - SHAPIRO (B)
Biochim.Biophys.Acta ; 137, 1967, 202.

(74) - DICKEN (CH) - DECKER (RH)
J.Invest.Dermatol ; 47 (5), 1966, 426.

(75) - DIENGDOH (JO)
Quart.J.Micrc.Sci ; 105, 1964, 73.

(76) - DE DUVE (C) - PRESSMAN (BC) - WATTIAUX (R)
Biochem.J ; 60, 1955, 604.

(77) - IQBAL (M) - WYNN (CH)
Enz.Biol.Clin ; 2, 1970, 360.

(78) - GIANETTO (R) - DE DUVE (C)
Biochem J ; 59, 1955, 433

(79) - LOWRY (OH) - ROSEMBROUGH (NJ) - FARRAND (AL) - RANDALL (RJ)
J.Biol.Chem ; 193, 1951, 265.

(80) - FISKE - SUBBAROW (Y)
J.Biol.Chem. ; 66, 1925, 375.

(81) - CAMPBELL (DM) - MOSS (DW)
Clin.Chim.Acta ; 6, 1961, 307.

(82) - KING (EJ) - JEGATHEESAN (KA)
J.Clin.Pathol ; 12, 1959, 85.

(83) - LEVY (J) - TCHOUBAR (B)
Annal.Pharmacol ; 5, 1952, 144.

(84) - MICHAELIS (L) - SHUBERT (MP)
J.Biol.Chem ; 106, 1934, 331.

(85) - JOHNSTON (JM) - GALLAGHER (A)
J.Org.Chem ; 28, 1963, 1306.

(86) - REISNER (DB)
J.Amer.Chem.Soc ; 78, 1956, 5102.

(87) - JEFFRAY (H)
Adv.Tracer.Methodol ; 1, 1963, 119.

(88) - AUBIN (G) - ABRIOUX (A) - LEROY (J)
Brevet France - 71 - 02994

(89) - APPLETON (TC)
J.R. Micr.Soc ; 83, 1964, 277.

(90) - CARO (LG)
J.Biophys.Biochem.Cytol ; 10, 1961, 37.

(91) - ROGERS (W)
"Technics of Autoradiography" - Elsevier's edt - London - 1967

(92) - JOFTES (DL)
J. Nucl.med. ; 4, 1963, 143.

(93) - BACQ (EM)
IV symposium on organic sulphur - Venise - 1970

(94) - ROSETT (J) - OHKIDO (M) - SMITH (G) - YARDLEY (H)
J.Invest.Dermatol ; 48 (1), 1967, 67.

(95) - FREEDBERG (I) - FINE (H) - CORDELLE (F)
J.Invest.Dermatol ; 48, 1967, 55.

(96) - CLARKE (R) - ROGERS (G)
J.Invest.Dermatol ; 55, 1970, 419.

(97) - BHATTACHARAYA (M) - CARRUTHERS (C)
J.Soc.Cosmet.Chemists ; 22, 1971, 95.

(98) - MOULE (Y)
Arch.Sci.Phys ; 7, 1953, 161.

(99) - MOULE (Y) rapporté par LOISELEUR
Tech.de lab.edt.Masson-Tome 1-fasc.2-p.1193

(100) - SHAMBERGER (RJ)
Biochem.J ; 111, 1969, 375.

(101) - BEAUFAY (H)
Lysosomes a laboratory Handbook
Dingle (JT) edt. North.Holland

(102) - MOTTAZ (JM) - THORNE (GE) - ZELICKSON (AS)
Acta.Dermato.Venereol ; 51, 1971, 335.

(103) - BRANDES (D) - BERTINI (F)
Exper.Molecul.Pathol ; 4, 1965, 245.

(104) - COTTET (J) - ETIENNE (J)
Bull. Acad. Nat. Med., 149, 1965, 331.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION GENERALE 1

PREMIERE PARTIE : INCORPORATION D'ACIDE OLEIQUE 10^{-14}C DANS LES LIPIDES CUTANES DU RAT EN PRESENCE OU NON DE DERIVES SOUFRES 5

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES 6

1) Choix des animaux 6
2) Répartition des animaux, expérience in vivo.. 6
3) Expérience in vitro 10
4) Extraction purification des lipides totaux... 11
5) Séparation des lipides totaux en lipides neutres et phospholipides 11
6) Séparation des acides gras des lipides neutres 13
7) Fractionnement des lipides neutres sans acides gras 14
8) Fractionnement des phospholipides 15
9) Analyse des différentes fractions 15

CHAPITRE II : RESULTATS EXPERIMENTAUX 22

1) Incorporation cutanée d'oléate de sodium 10^{14}C chez les rats sains nourris normalement, à jeun et à jeun traités au chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine 22
2) Incorporation cutanée d'oléate de sodium 10^{14}C chez les rats carencés en biotine - carencés en biotine traités avec le chlorhydrate de benzyl thio-2-éthylamine - carencés en biotine et à jeun - carencés en biotine à jeun et traités au BTE - carencés en biotine, à jeun et traités à la thio-2-éthylamine 30
3) Incorporation cutanée d'oléate de sodium 10^{14}C chez les rats sains traités ou non par des dérivés cystéaminiques ou cystéiniques..... 32

CHAPITRE III : DISCUSSION 35

Pages

. DEUXIEME PARTIE : ACTION DE QUELQUES DERIVES SOUFRES SUR LES PHOSPHATASES ACIDES EPIDERMIQUES DU RAT 41

CHAPITRE I : INTRODUCTION 42

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES 45

1) Source enzymatique 45
2) Technique d'incubation 46
3) Dosage des protéines et du phosphore 47

CHAPITRE III: RESULTATS EXPERIMENTAUX 51

1) Vitesse de la réaction enzymatique avec un substrat β glycérophosphate 51
2) Activité des phosphatases acides en fonction du pH 51
3) Inhibition des phosphatases acides par le malate de benzyl thio-2-éthylamine 53
4) Etude cinétique de l'activité des phosphatases acides en présence ou non de différentes concentrations d'inhibiteur (Malate de BTE) pour des concentrations variables du substrat (β glycérophosphate) et une quantité fixe de la protéine enzyme 53
5) Etude comparative de l'action de quelques dérivés soufrés sur l'activité des phosphatases acides : relations structure activité. 64
6) Action de quelques dérivés soufrés sur un substrat α glycérophosphate 76

CHAPITRE IV : DISCUSSION - CONCLUSION 79

. TROISIEME PARTIE : DISTRIBUTION ET DEVENIR METABOLIQUE DE LA S.CARBOXYMETHYLCYSTEINE ET DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE CHEZ LE RAT 82

CHAPITRE I : INTRODUCTION 83

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES 85

1) Préparation et contrôle des molécules injectées 85
2) Techniques biologiques utilisées 86
3) Techniques analytiques utilisées 87
4) Expression des résultats 93

CHAPITRE III: DISTRIBUTION ET DEVENIR METABOLIQUE DE LA ^{35}S. CARBOXYMETHYLCYSTEINE CHEZ LE RAT 94

1) Transport sérique et élimination urinaire .. 94
2) Activité dans le peau totale, le derme et l'épiderme 97
3) Activité dans les poils 100
4) Autoradiochromatographies des urines 100
5) Expériences complémentaires 103
6) Conclusion 104

Pages

CHAPITRE IV : DISTRIBUTION ET DEVENIR METABOLIQUE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE CHEZ LE RAT 106

1) Transport sérique et élimination urinaire. 106
2) Activité dans la peau totale, le derme et l'épiderme 109
3) Autoradiochromatographies des urines 112
4) Conclusion 115

CHAPITRE V : DISTRIBUTION ET DEVENIR METABOLIQUE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C CHEZ LE RAT 116

1) Transport sérique et élimination rénale ... 116
2) Incorporation dans quelques organes 119
3) Activité dans la peau totale, le derme et l'épiderme 121
4) Activité dans les poils 123
5) Autoradiochromatographies des urines 126
6) Autoradiochromatographies d'un broyat d'épiderme 128

CHAPITRE VI : CONCLUSION GENERALE 129

QUATRIEME PARTIE : RECHERCHE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C DANS LES ORGANITES SUBCELLULAIRES ISOLES DE L'EPIDERME DU RAT 132

CHAPITRE I : INTRODUCTION 133

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES 134

1) Fractionnement des organites subcellulaires épidermiques du rat 134
2) Etude morphologique du matériel extrait .. 140
3) Analyse biochimique du matériel extrait ... 142
4) Localisation subcellulaire des métabolites ^{14}C du BTE 150

CHAPITRE III: ANALYSE DES SURNAGEANTS S3 et S4 APRES PASSAGE SUR COLONNE DE SEPHADEX 151

1) Analyse du surnageant S3 après passage sur colonne de Séphadex 151
2) Analyse du surnageant S4 après passage sur colonne de Séphadex 153

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA REPARTITION DE L'ACTIVITE DU CHLORHYDRATE DE BENZYL THIO-2-ETHYLAMINE 1,2 ^{14}C DANS LES ORGANITES SUBCELLULAIRES ISOLES PAR ULTRACENTRIFUGATION 154

1) Identification morphologique et biochimique du matériel extrait 154
2) Recherche des métabolites ^{14}C au niveau des organites épidermiques 169

Nous remercions Mesdames les secrétaires du Docteur MANOUSSOS, Monsieur DUCOIN et le service technique de l'OREAL qui ont assuré la présentation de cette thèse.

ACADÉMIE DE PARIS

UNIVERSITÉ DE PARIS VI

4, Place Jussieu - 75230 PARIS-CEDEX 05

SERVICE DE LA SCOLARITE

Bureau des Enseignements du 3e cycle

TÉLÉPHONE : 336-25-25 - 325-12-21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : D'ETAT

THESE DE : ES SCIENCES NATURELLES

NOM : BROD

Prénoms : Joël

né le 17 Avril 1940 à LORIENT Dépt : Morbihan

1ère THESE : Action de certains dérivés soufrés sur le métabolisme lipidique cutané du rat

2e THESE (Propositions faites par l'Université) :

Président: Mr. POLONOWSKI
PASCAUD
PRUNIERAS
MANOUSSOS
AUBIN

ACADEMIE DE PARIS
UNIVERSITÉ PARIS VI

Vu et Approuvé

PARIS, le 19 Juin 1973

Le Président

de l'Université de PARIS VI